

# Univerzita Karlova v Praze

## Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Heterologní exprese a izolace lidských isoform cytochromů P450 1A1/2  
Heterologous expression and isolation of human cytochromes P450 1A1/2

*Diplomová práce*

Bc. Jan Milichovský  
Školitel: RNDr. Václav Martínek, Ph.D.

Praha 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 31.8.2011

Podpis:

### **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému školiteli, RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D., za zadání tohoto tématu. Chci mu dále poděkovat za jeho vedení, poskytnutou podporu a za jeho trpělivost.

Dále také děkuji RNDr. Věře Černé, Ph.D., za její rady a poskytnutý materiál. Také chci poděkovat Mgr. Tereze Hálkové za její ochotu při zaučování do metod molekulární biologie.

Děkuji i všem ostatním členům Laboratoře molekulární karcinogeneze a vývoje léčiv za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Tato diplomová práce vznikla na katedře biochemie PřF UK v Praze za podpory grantu Grantové agentury České republiky 203/09/0812.

## Abstrakt

Cytochromy P450 tvoří velmi početnou rodinu hemoproteinů. Řada z nich je zodpovědná za metabolismus endogenních látek, ale velmi významnou roli hrají i v detoxifikaci cizorodých látek (xenobiotik) a také v aktivaci některých z nich na reaktivní karcinogeny tvořící kovalentní adukty s DNA a zvyšující vnitrobuněčný oxidativní stres. Pro cytochromy P450 je typická nízká substrátová specifita, takže jeden enzym může oxidovat desítky až stovky různých substrátů. Mezi enzymy metabolizující planární aromatické sloučeniny (např. polycyklické aromatické uhlovodíky, azobarviva atd.) patří cytochrom P450 1A1, a dále cytochrom P450 1A2, který vykazuje podobnou substrátovou specifitu, ale preferuje mírně bazické aromáty, a mezi jinými metabolizuje například kofein.

Tato práce se zabývá (i) přípravou expresních vektorů kódující geny lidských forem cytochromů P450 1A1 a 1A2, (ii) heterologní expresí těchto proteinů a (iii) izolací těchto lidských forem cytochromu P450. V rámci práce byly geny kódující oba proteiny proteiny upraveny a přeneseny ze starších vektorů do vysoce účinných expresních plasmidů pET-22b. Jelikož však exprese v nových plasmidech neposkytovala nativní protein, byly připraveny expresní vektory s využitím původního expresního plasmidu pCW, které nesly upravený gen cytochromu P450 1A2. Kvůli problémům s inkorporací lidských forem proteinu byl ale exprimován a následně izolován protein s modifikací na N-konci proteinové sekvence.

Izolace byly provedeny s využitím kroků odlišných od klasického izolačního protokolu pro rekombinantní cytochromy P450 rodiny 1A. Ačkoliv byl výtěžek nižší než při běžně prováděných krocích, byly položeny základy izolačního postupu s nižší koncentrací inhibitoru, jinak běžně používaného pro stabilizaci struktury těchto cytochromů P450 v přítomnosti detergentů.

Klíčová slova: cytochrom P450, heterologní exprese, izolace

## Abstract

Cytochromes P450 form a large family of hemoproteins. Some of them are responsible for the metabolism of endogenous substrates, but their major role is in detoxification of exogenous substrates (xenobiotics), some of them are activated to reactive species forming covalent adducts with DNA and increasing intracellular oxidative stress. Cytochrome P450 are considered by very promiscuous in terms of their substrate specificity, thus one enzyme can typically oxidize many substrates. Cytochrome P450 1A1 prefers a planar aromatic compounds (e.g. polycyclic aromatic hydrocarbons, azo dyes, etc.). Cytochrome P450 1A2 elicits similar substrate specificity, but prefers slightly basic aromatic derivatives, for example caffeine.

This work focuses on (i) the preparation of expression vectors containing genes encoding human cytochromes P450 1A1 and 1A2, (ii) their consequent expression in heterologous system followed by (iii) isolation of corresponding proteins. The genes coding both proteins were modified and transferred from older vectors to the more efficient to expression plasmids pET-22b. However, the new constructs did not produce stable native proteins. The modified genes were therefore transferred to the original expression plasmids pCW. The problem with the incorporation of native human form of cytochrome P450 1A2 into prokaryotic membrane, was finally solved by an N-terminal modification of the protein.

Isolation was performed using steps diverting from the classical isolation protocol for recombinant cytochrome P450 1A family. Although the yield was lower than in published protocol, the ground for modified isolation procedure, utilizing lower concentrations of alpha-naphthoflavone inhibitor otherwise commonly used to stabilize the structure of cytochrome P450 in the presence of detergents, were established. (In Czech)

Keywords: cytochrome P450, heterologous expression, isolation

# Obsah

Seznam zkratk .....	8
1. Úvod .....	10
1.1 Chemická karcinogeneze .....	10
1.2 Cytochromy P450 .....	11
1.2.1 Nomenklatura cytochromů P450 .....	11
1.2.2 Reakční mechanismus cytochromu P450 .....	12
1.2.3 Lokalizace cytochromu P450 v savčí buňce .....	15
1.3 Lidské cytochromy P450 a jejich funkce .....	17
1.4 Cytochromy P450 podrodiny 1A .....	19
1.4.1 Cytochrom P450 1A1 .....	19
1.4.2 Cytochrom P450 1A2 .....	21
1.5 Heterologní exprese savčích cytochromů P450 v bakteriích <i>Escherichia coli</i> .....	22
1.5.1 Heterologní exprese lidského CYP1A1 .....	24
1.5.2 Heterologní exprese CYP1A2 .....	25
1.5.3 Plasmid pCW .....	26
1.5.4 Klonovací plasmid pUC19 .....	28
1.5.5 Plasmid pET-22b .....	29
2. Cíle diplomové práce .....	31
3. Materiál a metody .....	32
3.1 Použité přístroje .....	32
3.2 Použitý materiál a chemikálie .....	33
3.3 Metody .....	35
3.3.1 Příprava agarových ploten s ampicilinem .....	35
3.3.2 Příprava kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> .....	35
3.3.3 Transformace buněk <i>Escherichia coli</i> .....	36
3.3.4 Přeočkování bakteriálních buněk metodou „single-cell“ .....	37
3.3.5 Minipreparace DNA pomocí kitu JETquick-Plasmid Miniprep Spin Kit .....	37
3.3.6 Midipreparace DNA pomocí kitu Gen Elute™ Plasmid Midiprep Kit .....	38
3.3.7 Maxipreparace DNA pomocí kitu GeneAid Plasmid Maxi Kit .....	39
3.3.8 Izolace DNA z agarosového gelu pomocí kitu .....	40
3.3.9 Polymerasová řetězová reakce - PCR .....	41
3.3.10 Štěpení DNA pomocí endonukleas EcoRI a HindIII .....	44

---

3.3.11	Štěpení DNA pomocí endonukleas <i>Xho</i> a <i>NdeI</i> .....	45
3.3.12	Štěpení DNA pomocí endonukleas <i>NdeI</i> a <i>HindIII</i> .....	46
3.3.13	Štěpení DNA pomocí endonukleasy <i>NdeI</i> .....	46
3.3.14	Ligace .....	47
3.3.15	Příprava vzorků DNA na sekvenaci .....	47
3.3.16	Horizontální agarosová elektroforéza DNA .....	47
3.3.17	Určení koncentrace a čistoty DNA.....	48
3.3.18	Elektroforéza SDS-PAGE.....	49
3.3.19	Stanovení koncentrace cytochromu P450 .....	50
3.3.20	Kultivace buněk <i>E. coli</i> pro testovací expresi.....	51
3.3.21	Kultivace buněk <i>E. coli</i> ve větším množství média.....	51
3.3.22	Příprava sferoplastů.....	53
3.3.23	Dezintegrace buněk <i>E. coli</i> .....	53
3.3.24	Příprava membránové frakce .....	54
3.3.25	Solubilizace proteinů z bakteriální membrány .....	54
3.3.26	Chromatografie na koloně DEAE Sepharosy CL-6B.....	54
3.3.27	Chromatografie na koloně CM Sepharosy CL-6B.....	56
3.3.28	Chromatografie na koloně hydroxylapatitu .....	56
3.3.29	Chromatografie na koloně Sephadexu G-100 .....	57
4.	Výsledky .....	58
4.1	Příprava CYP1A1.....	58
4.1.1	Charakterizace vektoru .....	58
4.1.2	Amplifikace insertu obsahujícího lidský gen <i>CYP1A1</i> .....	60
4.1.3	Vložení insertu <i>CYP1A1</i> do plasmidu <i>pUC19</i> .....	61
4.1.4	Ověření vektoru <i>1A1/pUC</i> sekvenací DNA a jeho midipreparace.....	61
4.1.5	Přenesení insertu <i>CYP1A1</i> do plasmidu <i>pET-22b</i> .....	63
4.1.6	Exprese cytochromu P450 <i>1A1</i> pomocí vektoru <i>1A1/pET</i> .....	64
4.1.7	Exprese cytochromu P450 v buňkách <i>E. coli</i> pomocí vektoru <i>1A1/pCW</i> .....	66
4.2	Příprava CYP1A2.....	68
4.2.1	Charakterizace vektoru .....	68
4.2.2	Amplifikace insertu obsahující lidský gen <i>CYP1A2</i> .....	70
4.2.3	Vložení insertu genu <i>CYP1A2</i> do klonovacího plasmidu <i>pUC19</i> .....	72
4.2.4	Ověření vektoru <i>1A2/pUC</i> sekvenací DNA a jeho midipreparace.....	72

---

4.2.5	<i>Přenesení genu CYP1A2 do plasmidu pET-22b</i> .....	75
4.2.6	<i>Expres cytochromu P450 1A2 pomocí vektoru 1A2/pET</i> .....	75
4.2.7	<i>Příprava vektorů 1A2/pCW a 1A2Nm/pET</i> .....	77
4.2.8	<i>Expres cytochromu P450 1A2 pomocí dalších vektorů</i> .....	78
4.3	<i>Izolace cytochromu P450 1A2Nm</i> .....	80
4.3.1	<i>První izolace CYP1A2Nm</i> .....	81
4.3.2	<i>Druhá izolace CYP1A2Nm</i> .....	85
5.	<i>Diskuse</i> .....	90
6.	<i>Závěr</i> .....	95
7.	<i>Seznam literatury</i> .....	96



## Seznam zkratek

$\alpha$ -NF	$\alpha$ -naftoflavon
A	adenin
ALA	$\delta$ -aminolevulová kyselina
bp	párů bází („Base Pairs“)
BSA	hovězí sérový albumin
C	cytosin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CM	karboxymethyl
CYP	cytochrom P450
CYP1A2Nm	protein; cytochrom P450 1A2 s modifikací na N-konci
<i>CYP1A2Nm</i>	gen; cytochrom P450 1A2 s modifikací na N-konci
DEAE	diethylaminoethyl
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
G	guanin
HAP	hydroxylapatit
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktosid
LB médium	Luria Brooth médium
MQ	deinizovaná voda
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NADH	nikotinamidadenindinukleotid

NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát (redukována forma)
OD <sub>600</sub>	optická denzita při 600 nm
ori	počátek replikace DNA
PCR	polymerasová řetězová reakce
RPM	otáčky za minutu („revolutions per minute“)
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíránů sodných
T	thymín
TB médium	Terrific Brooth médium
TCDD	2,3,7,8, - tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
TEMED	N,N,N', N'- tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	„volume/volume“, objem látky v mililitrech ve 100 ml
w/v	„weight/volume“, počet gramů látky ve 100 ml roztoku

# 1. Úvod

## 1.1 Chemická karcinogeneze

Karcinogeneze je definována jako proces vzniku nových buněk (novotvaru, tumoru), jejichž růst není kontrolován organismem. Tyto buňky ničí okolní tkáň a mohou se pomocí metastáz rozšiřovat do ostatních částí těla. Nemoc je běžně označována jako rakovina a je po srdečních chorobách druhou nejčastější příčinou smrti. Odhaduje se, že je zodpovědná za 20-25 % všech úmrtí ve vyspělých zemích.

V mnoha případech rakoviny zůstává konkrétní příčina onemocnění neznámá. Během procesu vzniku rakovinných buněk se předpokládá, že musí dojít k řadě změn ve struktuře DNA. Často bývají zasaženy klíčové geny zapojené v regulaci růstu buňky (proto-onkogeny). Ke genetickým změnám (mutacím) dochází buď spontánně, tedy náhodnými chybami při každé replikaci DNA, nebo působením vnějších faktorů. Pokud nejsou tyto mutace opraveny opravnými mechanismy buňky, dochází k jejich kumulaci a k trvalým změnám funkce buňky.

Vznik rakoviny je ovlivňován genetickými dispozicemi, životním stylem a prostředím. Mezi rakovinotvorné faktory prostředí lze zařadit fyzikální vlivy (radiace) a působení chemických karcinogenů a onkovirů. Tyto vlivy zvyšují množství genetických změn a tím i podíl těchto mutací, který unikne dohledu reparačních mechanismů [1].

Chemické karcinogeny zahrnují mnoho typů sloučenin, například polycyklické aromatické uhlovodíky, aromatické aminy a amidy, heterocyklické aminy, N-nitrososloučeniny, nitroareny a alkaloidy. Jak je patrné z uvedených příkladů, chemické karcinogeny jsou velmi rozdílné. I přesto ale důkazy získané jejich výzkumem naznačují, že jejich karcinogenní mechanismus je velmi podobný – jedná se o reaktivní sloučeniny, například elektrofilů nebo reaktivní kyslíkové intermediáty a jejich prekurzory, které reagují s DNA a způsobují tak genetické změny [2].

Mnoho karcinogenních chemických sloučenin tedy po vniknutí do organismu potřebuje metabolickou aktivaci. Stejně jako další xenobiotika, i tyto sloučeniny podstupují detoxikační biotransformační reakce dělené do dvou fází. V I. fázi dochází k derivatizaci xenobiotika připojením reaktivních skupin, což je následováno II. fází určenou pro připojení polární endogenní látky k pozměněné exogenní sloučenině. U živočichů často biotransformaci zakončuje III. fáze se zapojením transportních ABC proteinů.

Jednou z hlavních skupin enzymů I. fáze biotransformace, které se podílí na aktivaci chemických karcinogenů, jsou cytochromy P450 [2].

## 1.2 Cytochromy P450

Tyto proteiny (EC 1.14.14.1) byly objeveny na konci šedesátých let v potkaních mikrosomech (fragmentech endoplasmatického retikula) [3]. Později byly nalezeny u dalších prokaryotických a eukaryotických forem života a také u virů. Přehled charakterizovaných cytochromů P450 uvádí tabulka 1.

**Tab. 1 Zařazené cytochromy P450 dle typu organismu, k březnu 2010. Převzato z [4].**

Typ organismu	Počet cytochromů P450
Živočichové	4088 <sup>1)</sup>
Rostliny	4267
Houby	2784 <sup>2)</sup>
Protisté	247
Bakterie	1042
Archaeobakterie	26
Viry <sup>3)</sup>	2

1) přes 1000 cytochromů P450 není zařazeno

2) databáze „Fungal Cytochrome P450 Database“ obsahuje dalších 5270 nepojmenovaných cytochromů P450

3) taxonomické řazení virů není vyřešeno, lze je považovat i za makromolekuly

Cytochromy P450 se pravděpodobně vyvinuly divergentní evolucí z jednoho genu v superrodinu proteinů katalyzujících velkou škálu reakcí. Vznik prvního proteinu cytochromu P450 je odhadován u předchůdce prokaryot před 3,5 miliardami let [5]. Typ cytochromu P450 z acidotermofilní bakterie *Sulfolobus solfataricus* je velmi odolný zvýšené teplotě i tlaku, tedy podmínkám panujícím v dávné minulosti Země [6].

### 1.2.1 Nomenklatura cytochromů P450

Dlouhou dobu používali vědci pro tyto proteiny několik odlišných nomenklatur a jednotlivé typy proteinů měly i několik jmen. V polovině osmdesátých let dvacátého století byla vytvořena Komise pro standardizovanou nomenklaturu eukaryotických cytochromů P450, která vydala své první doporučení pro sjednocení nomenklatury [7]. Komise původně publikovala svá doporučení každé dva roky s ohledem na nově objevené proteiny

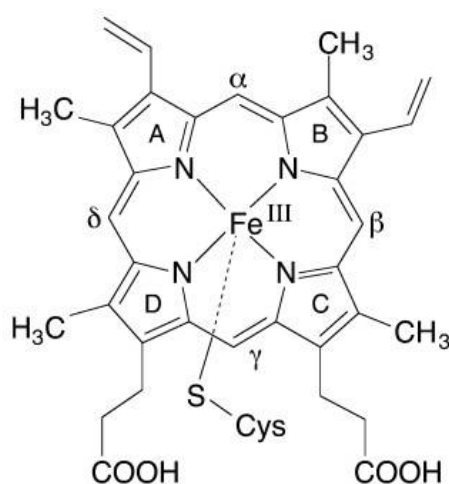
a geny cytochromů P450, od devadesátých let byla nomenklatura doplňována s delším odstupem.

Nomenklatura byla vytvořena srovnáváním aminokyselinových sekvencí cytochromů P450, načež byla tato superrodina proteinů rozdělena do rodin a podrodin podle těchto pravidel [4,7].

- z názvu proteinu „cytochrom P450“ se vytvoří zkratka CYP.
- proteiny, jejichž primární struktura má homologii vyšší než 40 % se zařadí do stejné rodiny a označí se arabskou číslicí (např. CYP1).
- proteiny, které mají homologii aminokyselinové sekvence vyšší, než 55 % se řadí do jedné podrodiny označené písmenem (např. CYP1A).
- samotná forma proteinu je po zařazení do rodiny a podrodiny označena pořadovým číslem (např. CYP1A1).

### 1.2.2 Reakční mechanismus cytochromu P450

Cytochromy P450 jsou hemoproteiny, jejichž prosthetická skupina hemu (protoporfyrinu IX) v aktivním centru je přes železo vázána k cysteinovému zbytku (obrázek 1). Tento konzervovaný cystein je pátým ligandem hemového železa a je odpovědný za charakteristický posun absorpčního maxima do oblasti 450 nm, který nastává při vytvoření komplexu s oxidem uhelnatým [8,9].



**Obr. 1 Hem**

Prostetická skupina cytochromů P450 vázaná přes centrální atom železa k cysteinovému zbytku. Převzato z [8].

Tedy do reakce se substrátem je použit jen jeden kyslíkový atom, a proto je cytochrom P450 řazen mezi monooxygenasy [10].

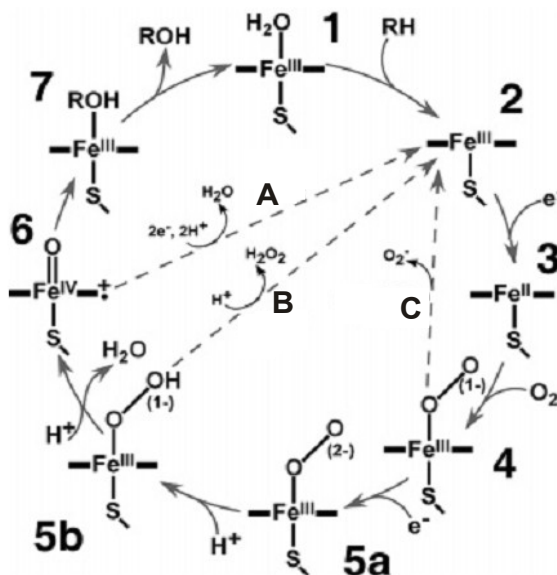


Cytochromy P450 se řadí do dvou tříd v závislosti na proteinu dodávajícím reakční elektrony, které jsou získávány z kofaktorů NAD(P)H [11]:

- třída I obsahuje enzymy, kterým dodává elektrony FeS protein. Ten je získává z reduktasy obsahující doménu vázající FAD. Jedná se o většinu bakteriálních a savčích mitochondriálních cytochromů P450.
- třída II obsahuje cytochromy P450, které získávají elektrony prostřednictvím reduktas obsahujících FAD a FMN kofaktory. Do této třídy jsou řazeny enzymy lokalizované v membráně endoplasmatického retikula, které využívají NADPH: cytochrom P450 reduktasu.
- výjimku tvoří některé nezávislé cytochromy P450 z bakterií a hub. Disponují doménami obsahujícími FAD a FeS motiv, které plní funkci reduktasy [12].

Podrobnější informace o reakčním cyklu cytochromu P450 podává obrázek 2 a přidružený text [8]:

- substrát vázící se na nízkospinovou ferri-formu proteinu (**1**) do okolí aktivního centra způsobí odstoupení molekuly vody, která je v klidovém stavu vázána k hemovému železu jako šestý ligand. To změní nízkospinový komplex na vysokospinový (**2**). Tento stav je nazýván také „resting state“.



**Obr. 2 Reakční schéma cytochromu P450.**

Bližší informace v textu. Převzato a upraveno z [6].

- vysokospinová forma má více pozitivní redukční potenciál a je prvním elektronem redukována na ferro-formu (3). V tomto kroku se může na atom železa vázat také oxid uhelnatý.
- na redukované železo se váže molekula kyslíku a ustavuje se oxo-ferri komplex (4).
- následuje redukce druhým elektronem, čímž vzniká peroxo-ferri forma (5a). Ta je protonována za vzniku hydroperoxo-ferri formy (5b).
- vzdálenější atom kyslíku od atomu železa je redukován a dochází k hydrolyze vazby mezi atomy kyslíku, formuje se oxo-ferryl intermediát zvaný „sloučenina I“ (6) a voda.
- posledním krokem je oxygenace produktu a jeho uvolnění (7).

Oxo-ferro komplex (4) je posledním relativně stabilním intermediátem cyklu. Podoba následných intermediátů je stále předmětem výzkumu.

V mechanismu se nachází také tři zpětné reakce:

- A) Oxdasová cesta, během které je kyslík vázaný v oxo-ferryl intermediátu oxidován na vodu, aniž je zapojen do oxygenace substrátu.
- B) Peroxidová cesta, při které se vodík naváže na neprotonizovaný kyslík a z atomu železa disociuje peroxid vodíku.

- C) Autooxidace oxo-ferri formy s návratem do vysokospinové ferro-formy se vznikem superoxidového aniontu.

### 1.2.3 Lokalizace cytochromu P450 v savčí buňce

Většina eukaryotických cytochromů P450 byla nalezena na membráně endoplasmatického retikula [13]. Další se nacházejí ve vnitřní membráně mitochondrie [14].

V endoplasmatickém retikulu jsou orientovány krátkou N-terminální sekvencí do lumenu a C-terminální doménou do cytoplasmy, přičemž jsou v membráně ukotveny krátkou hydrofobní sekvencí, která slouží jako signální sekvence pro transport do této části buňky [15]. Nepolární aminokyseliny na N-konci proteinu jsou z obou stran obklopeny nabitými aminokyselinami, jejichž přítomnost je důležitá pro správnou topologii v membráně endoplasmatického retikula. Jak ukazuje obrázek 3, bazické aminokyseliny se nacházejí za nepolární sekvencí. Jejich vložení před tuto sekvenci vede k převrácené topologii a tím vystavení aktivní části proteinu do lumenu [16].

```

CYP1A1      -----MLFPISMSATEFLLASVIFCLVFWVIRASRPQVPKGLKN
CYP1A2      -----MALSQSSVPFSATELLLASAIFCLVFWVIRGLRPRVPKGLKS
CYP11A1     -----MLAKGLPPRSVLVKGCTFLSAPREGGLRLRVPTGEGAG*IS

```

**Obr. 3 Srovnání N-terminálních úseků tří lidských cytochromů P450, dvou mikrosomálních a jednoho mitochondriálního**

Modře vyznačena cílová sekvence pro transport do membrány endoplasmatického retikula, červeně bazické aminokyseliny, zeleně kyselé aminokyseliny; hvězdička značí štěpící místo pro odštěpení signální sekvence. Převzato a upraveno z [13,17].

Mitochondriální cytochromy jsou orientovány do matrixu mitochondrie. Při svém katalytickém cyklu spolupracují s dvěma rozpustnými proteiny, NADPH-adrenodoxin reduktasou a adrenodoxinem, a jsou tak podobné bakteriálním cytochromům P450. Přesto není jejich vznik odvozován od bakterií, ale od mikrosomální formy. K vývoji této formy pravděpodobně došlo po oddělení živočišné a rostlinné říše, protože v rostlinných mitochondriích se cytochromy P450 nenachází [18]. Signální sekvence pro transport do mitochondrie se nachází na N-konci proteinu a sestává z několika bazických aminokyselin situovaných mezi neutrální a hydrofobní aminokyseliny. Po transportu do mitochondrie je



sekvence odštěpena peptidasou a následně je protein inkorporován do membrány. Aktivní místo směřuje do matrix [19].

V myších a potkaních mitochondriích byly také později nalezeny i cytochromy P450, které patří do skupiny cytochromů P450 přítomných v membránách endoplasmatického retikula. Jsou vázané stejným způsobem jako jejich mitochondriální protějšky [20] a jsou katalycky aktivní, přičemž jejich katalytický cyklus je spojen s mitochondriální reduktasou a adrenodoxinem [21]. Molekulární mechanismy vysvětlující transport těchto cytochromů P450 do mitochondrií nejsou zcela známy, ale na základě pokusů byly navrženy dva možné způsoby:

- proteolytické štěpení N-terminální sekvence [22].
- fosforylace aktivující kryptickou mitochondriální cílovou sekvenci [23].

Fyziologický význam takto situovaných mikrosomálních cytochromů P450 není znám.

Cytochromy P450 byly nalezeny také na plasmatické membráně, a to i u člověka. Nejdříve byla jejich lokalizace potvrzena na tkáňových kulturách [24]. Přítomnost CYP2C9 na plasmatické membráně byla potvrzena nalezením protilátek u osob s autoimunitní hepatitidou vyvolanou kyselinou tienilovou, která byla aktivní látkou léku proti vysokému krevnímu tlaku. Tato kyselina zároveň působí jako sebevraždný substrát tohoto enzymu a lék byl krátce po uvedení na trh stažen z prodeje [25]. Dále byla prokázána přítomnost takto lokalizovaného CYP2E1 u lidí trpících hepatitidou vyvolanou haloethanem [26] a u pacientů s cirhózou jater [27].

Orientace cytochromu P450 v plasmatické membráně je nejasná, protože část výzkumných skupin našla aktivní místo otočené do cytoplasmy [28], jiné skupiny informovaly o jeho umístění do periplasmatického prostoru [24]. Takto lokalizované proteiny jsou navíc aktivní [29]. Pokusem s kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* exprimujícími CYP2D6 a NADPH: cytochrom P450 reduktasu byla prokázána aktivita cytochromu P450 vázaného v plasmatické membráně kvasinek, i když byl protein otočen aktivním centrem do periplasmatického prostoru, zatímco reduktasa měla aktivní místo otočeno do cytoplasmy [30].

Cytochromy P450 byly nalezeny také v Golgiho aparátu [31]. Není jasné, zda jde o poruchu transportu nebo jsou proteiny do tohoto kompartmentu odesílány cíleně. Stejně tak nejsou známy fyziologické funkce takto umístěných cytochromů P450.

### **1.3 Lidské cytochromy P450 a jejich funkce**

Sekvenací lidského genomu se množství genů cytochromu P450 ustálilo na 57 aktivních genech a 58 pseudogenech [32]. Z toho 50 genů kóduje proteiny vyskytující se na membráně endoplasmatického retikula a 7 genů kóduje mitochondriální formy. Jejich přehled uvádí tabulka 2. Tyto proteiny se nachází především v játrech, ale nalézají se i v dalších částech lidského těla.

Cytochromy P450 vázané v mitochondrii při svém enzymatickém cyklu získávají elektrony od NADPH přes dva rozpustné proteiny, NADPH: adrenodoxin reduktasu a adrenodoxin [33].

Mikrosomální cytochromy P450 naproti tomu spolupracují s NADPH: cytochrom P450 reduktasou, která je ukotvena v membráně endoplasmatického retikula [34]. Ta obsahuje flavinmononukleotid (FMN) a flavinadenindinukleotid (FAD) [35], což jsou kofaktory vyskytující se společně jen ve čtyřech savcích enzymech. Doména s FAD váže NADPH, zatímco doména s FMN se váže na cytochrom P450.

Aktivita cytochromu P450 je ale ovlivňována i přítomností cytochromu  $b_5$  a spolupracující NADH: cytochrom  $b_5$  reduktasy [36], i když původ tohoto vlivu není znám a bylo navrženo více možných mechanismů působení cytochromů  $b_5$  na cytochrom P450:

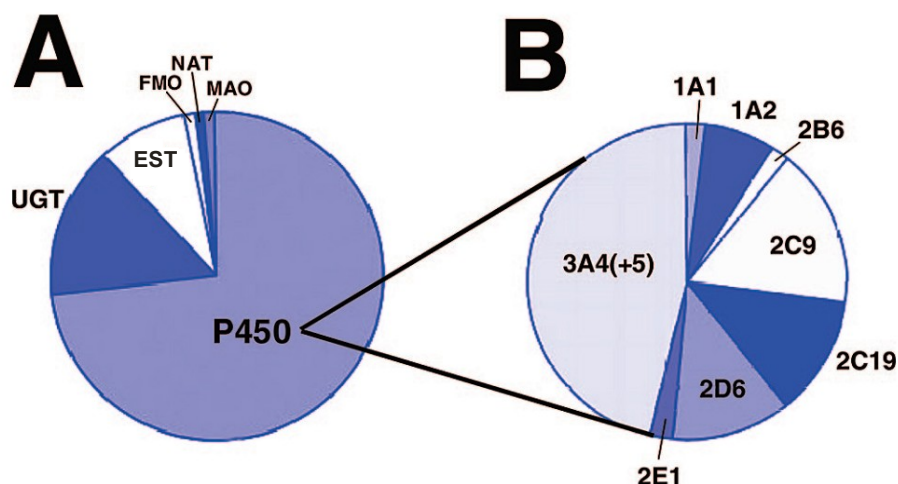
- přenos elektronů z NADPH: cytochrom P450 reduktasy na cytochrom  $b_5$  a následně na cytochrom P450 [37].
- přenos elektronů z NADH: cytochrom  $b_5$  reduktasy na cytochrom  $b_5$  a odtud na cytochrom P450 [38].
- elektronové přeskoky mezi cytochromem P450 a cytochromem  $b_5$  umožňující rychlý přenos druhého elektronu při vzniku produktu [39].
- redukce tvorby vzniklého superoxidu a peroxidu vodíku [40].
- alosterický efekt nezávislý na přechodu elektronů [41].

Jak bylo zmíněno v kapitole 1.1, jednou z hlavních funkcí cytochromů P450 je metabolismus cizorodých látek (xenobiotik), na kterém se podílí především rodiny CYP1, CYP2 a CYP3. Data z tabulky 2 ukazují, že ostatní rodiny cytochromů P450 zasahují do metabolismu sterolů, mastných kyselin a vitamínů.

**Tab. 2 Přehled lidských cytochromů P450 založený na typu hlavním substrátu**  
Převzato z [42].

Steroly	Xenobiotika	Mastné kyseliny	Eikosanoidy	Vitamíny	Neznámý substrát
1B1	1A1	2J2	4F2	2R1	2A7
7A1	1A2	4A11	4F3	24A1	2S1
7B1	2A6	4B1	4F8	26A1	2U1
8B1	2A13	4F12	5A1	26B1	2W1
11A1	2B6		8A1	26C1	3A43
11B1	2C8			27B1	4A22
11B2	2C9				4F11
17A1	2C18				4F22
19A1	2C19				4V2
21A2	2D6				4X1
27A1	2E1				4Z1
39A1	2F1				20A1
46A1	3A4				27C1
51A1	3A5				
	3A7				

Jak je zřejmé z obrázku 4, cytochromy P450 mají velký význam i v přeměně jiného typu xenobiotik – léčiv. I léčiva ale mohou být metabolizována na karcinogeny. V souvislosti s metabolismem léčiv se u cytochromů P450 také objevuje idiosynkratická (individuální) toxicita na určitá léčiva. Tu většinou nelze zachytit v preklinických studiích a je tak zjištěna až po uvedení léku na trh. Takovým případem může být nejen hepatitis vyvinutý u malého počtu pacientů v případě kyseliny teinilové v důsledku působení na CYP2C9 [25], ale též hepatitida způsobená podáváním dihydralazinu (antihypertenzivum) spojená s přítomností protilátek proti CYP1A2 [43].



**Obr. 4 Význam cytochromů P450 v metabolismu léčiv**

(A) podíl metabolismu léčiv (prvních 200 předepisovaných léčiv v USA) dle jednotlivých enzymů. FMO, flavinové monooxygenasy; NAT, N-acetyltransferasy; UGT, UDP-glukuronyltransferasy; EST, esterasy; MAO, monoaminoxidasy. (B) podíl jednotlivých cytochromů P450 na metabolismu léčiv, segment označený 3A4(+5) započítává i reakce, u kterých není znám přínos ostatních členů podrodiny 3A oproti CYP3A4 (převzato z [44]).

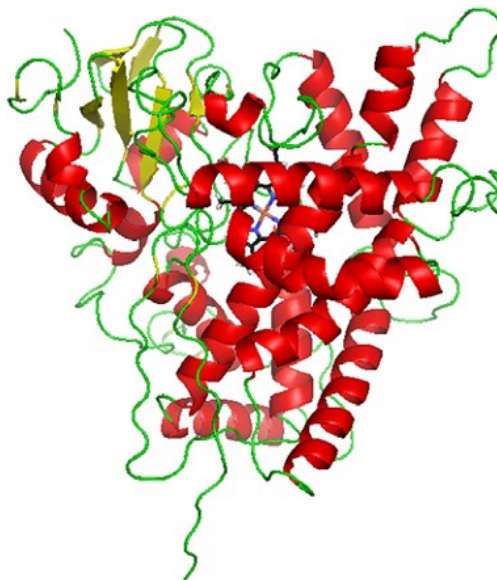
## 1.4 Cytochromy P450 podrodiny 1A

Podrodina CYP1A sestává ze dvou členů, CYP1A1 a CYP1A2. Oba proteiny jsou polymorfní, mají tedy více alel, které mohou vykazovat rozdílnou aktivitu u jejich nositelů.

### 1.4.1 Cytochrom P450 1A1

Tento protein sestávající z 512 aminokyselin se nachází především v extrahepatálních tkáních, v samotných játrech je jeho exprese nízká [45]. Byl nalezen v plicích, tenkém střevě, ledvinách, mozku, placentě a v kůži [46,47]. Na úrovni mRNA byl detekován v hrtanu a tlustém střevě [48,49]. Ačkoliv se v tkáních nachází v nízkých koncentracích, je vysoce inducibilní hlavně polycyklickými aromatickými uhlovodíky (např. TCDD) [46].

Cytochrom P450 1A1 metabolizuje řadu heterocyklických aminů a společně s CYP1B1 odpovídá za přeměny polycyklických aromatických uhlovodíků [50]. S CYP1B1 a CYP1A2 sdílí i celou řadu inhibitorů, například  $\alpha$ -naftoflavon, který je ale efektivnějším inhibitorem CYP1A2 [51].



**Obr. 5 Homologní model CYP1A1**

Model je založen na známé struktuře proteinu CYP1A2. Převzato z [52].

Tento enzym se stejně jako několik dalších mikrosomálních cytochromů P450 nachází i na vnitřní membráně mitochondrie. Potkaní protein, který měl jaterní endoproteasou odštěpeny čtyři N-koncové aminokyseliny, byl inkorporován právě do mitochondriální membrány, což vede k možnosti existence kryptického mitochondriálního transportního signálu [22]. Takto lokalizovaný CYP1A1 je schopen metabolizovat i erythromycin, čímž vykazuje odlišnou substrátovou specifitu oproti mikrosomální formě, což je nejspíš dáno spojením s mitochondriální NADPH: ferredoxin reduktasou [53].

Cytochrom P450 1A1 má 17 možných alel [54]. Výskyt těchto mutací v aminokyselinové sekvenci by mohl ovlivňovat katalytické schopnosti a tím ovlivňovat metabolismus xenobiotik a produkci karcinogenních látek, avšak to zatím u CYP1A1 nebylo obecně prokázáno. Epidemiologické studie sice naznačily možnost spojení mutace I462V s incidencí nádorů plic u japonské populace [55], to však nebylo potvrzeno u indoevropanů [56,57].

Struktura proteinu CYP1A1 není známa. Existuje několik homologních modelů vycházejících ze známých rentgenových struktur jiných cytochromů P450 a jednu z nich ukazuje obrázek 5 [52].

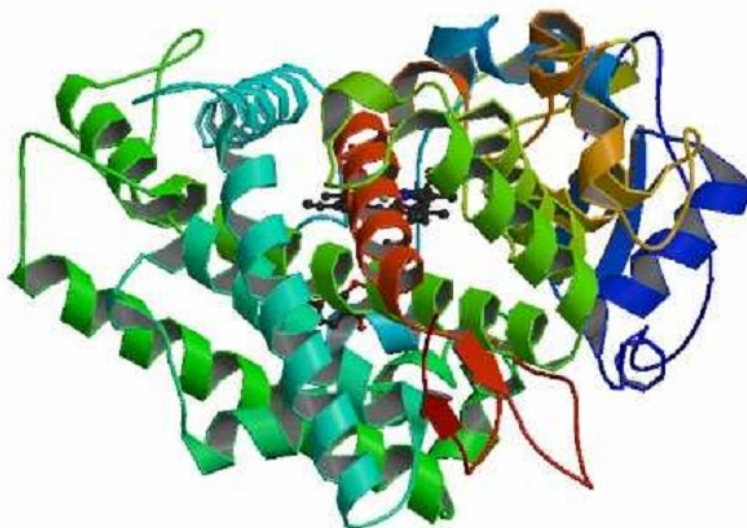
### 1.4.2 Cytochrom P450 1A2

Tento enzym je nejvíce přítomen v jaterní tkáni [58]. Dále byl detekován v plicích [59], mozku [60], prostatě a gastrointestinálním traktu a na úrovni mRNA v kůži [46]. Protein může být indukován N-heterocyklickými aminy v cigaretovém kouři a grilovaném mase [61]. Jeho koncentraci lze zvýšit například i konzumací brukvovité zeleniny (kedlubna, kapusta) a cvičením [62].

Protein sestávající z 515 aminokyselin je posttranslačně upraven odstraněním N-koncového methioninu [63]. Strukturu CYP1A2 (obr. 6) se podařilo získat krystalizací proteinu s upravenou sekvencí [64].

CYP1A2 metabolizuje celou řadu léčiv (například antipyretikum fenacetin [65], antipsychotikum klozapin [66]) a karcinogeny z řad aromatických a heterocyklických aminů [42]. Hlavními endogenními substráty jsou estron a  $17\beta$ -estradiol [67].

Mezi inhibitory CYP1A2 patří kromě již zmíněného  $\alpha$ -naftoflavonu i furafyllin. Tato látka byla zařazena do lékařských testů jako potenciální lék proti astmatu. Během první fáze testování byla u dobrovolníků zjištěna akumulace kofeinu a později byl furafyllin identifikován jako silný inhibitor CYP1A2, což vedlo k jeho vyřazení z testů [68].



**Obr. 6 Struktura lidského CYP1A2**

Struktura proteinu s pozměněným N-koncem byla získána rentgenovou strukturní krystalografií. Převzato z [64].

Protein má 25 alel [69]. Mutace *CYP1A2\*1F* způsobuje větší inducibilitu [70] a mutace *CYP1A2\*6* zasahuje do sestřihu mRNA [71], ale ostatní mutace vlastnosti proteinu příliš nemění.

## 1.5 Heterologní exprese savčích cytochromů P450 v bakteriích

### *Escherichia coli*

Cytochromy P450 byly exprimovány v kvasinkách [72], hmyzích buňkách [73], savčích buňkách [74] a bakteriích. Srovnání těchto expresních systémů ukazuje tabulka 3.

**Tab. 3 Srovnání expresních systémů pro expresi lidských cytochromů P450**  
Převzato z [75].

Faktory	Expresní systém			
	Kvasinky	Savčí buňky	Hmyzí buňky	Bakterie
Čas kultivace	Dny až týden	Týdny	Dny až týden	Hodiny až dny
Úroveň exprese	Střední	Nízká až střední	Vysoká	Vysoká
Technické požadavky pro expresi	Nízké	Vysoké	Střední	Nízké
Finanční nároky	Nízké	Vysoké	Vysoké	Nízké
Nutnost přidání ALA (δ-aminolevulová kyselina)	Není nutno	Není nutno	Většinou nutné	Většinou nutné
Přítomnost vlastních cytochromů P450	Ano	Ano	Ano	Ne
Úprava N-konce proteinu	Není nutná	Není nutná	Není nutná	Většinou nutná
Posttranslační modifikace	Ano	Ano	Ano	Ne

V bakteriích *E. coli* byl jako první savčí cytochrom P450 exprimován hovězí CYP17A1 a to díky změnám aminokyselin a několika kodonů na začátku cDNA, viz obrázek 7 [76].

Nativní CYP17A1	ATG	TGG	CTG	CTC	CTG	GCT	GTC	TTT	CTG
	Met	Trp	Leu	Leu	Leu	Ala	Val	Phe	Leu
Mutovaná CYP17A1	ATG	<b>GCT</b>	CTG	<b>TTA</b>	<b>TTA</b>	GCA	GTT	TTT	CTG
	Met	<b>Ala</b>	Leu	Leu	Leu	Ala	Val	Phe	Leu

**Obr. 7 Úprava prvních kodonů cDNA CYP17A1**

Změny jsou ukázány tučným písmem. Bližší informace v textu. Převzato z [76].

Záměna aminokyseliny tryptofan za alanin (aminokyseliny následující po iniciačním kodonu) byla provedena proto, že kodon GCT byl preferovaný pro expresi  $\beta$ -galaktosidasy (viz tabulka 4). Další změny zabránily tvorbě sekundárních struktur mRNA.

**Tab. 4 Efekt záměny druhého kodonu**

Efekt záměny druhého kodonu na expresi genu LacZ ( $\beta$ -galaktosidasy) pro tryptofan a alanin v bakterii *Escherichia coli*. Převzato a upraveno z [77].

Aminokyselina	Kodon	Efektivita <sup>a</sup>
Trp	TGG	0,1
Ala	GCT	0,9
Ala	GCC	0,7
Ala	GCA	0,6
Ala	GCG	0,1

<sup>a</sup>Efektivita je zde definována jako podíl  $\beta$ -galaktosidasy v celkovém proteinovém složení po 15 minutách exprese.

Těchto devět kodonů kódujících aminokyseliny MALLAVFL bylo použito u exprese dalších cytochromů P450, kdy bylo původních 20 kodonů, zhruba odpovídajících N-terminální hydrofobní doméně, nahrazeno právě touto sekvencí, což umožnilo expresi aktivních proteinů ve vyšším výtěžku oproti expresi proteinů se zcela nativními sekvencemi. Na N-terminálním konci byly prováděny i další úpravy zahrnující pouze záměnu druhé aminokyseliny [78], úplné odstranění hydrofobní části [64] nebo zavedení „univerzální expresní sekvence“ (MALLAVFLGLSCLLLS) pro králičí a lidské cytochromy P450 rodiny 2C [79].

Zvýšení exprese aktivního proteinu bylo dosaženo i současnou expresí chaperonů GroES/GroEL [80], Hsp40 [81] a Hsp70 [82]. Koexprese těchto chaperonů vedla v nejlepším případě k přibližně sedminásobné produkci aktivního proteinu.

Další možností je exprese cytochromů P450 do bakteriálního periplasmatického (mezimembránového) prostoru pomocí fúze 5'-konce cDNA cytochromu P450



s bakteriálním signálním peptidem, nejčastěji signálních sekvencí proteinů *ompA* nebo *pelB* [83]. Tato lokalizace ochraňuje proteiny před působením většiny bakteriálních proteas. Vyjma exprese vybraných cytochromů P450 se signálem *pelB* však tyto peptidy na proteinu zůstávají vázány i po přechodu do periplasmatického prostoru [75].

Exprimované a izolované savčí cytochromy P450 jsou rekonstituovány s enzymovým partnerem, NADPH:cytochrom P450 reduktasou. Rekonstituci *in vitro* lze nahradit expresí obou těchto enzymů bicistronickým konstruktem nesoucím jak gen pro příslušný cytochrom P450, tak pro reduktasu. Membrány izolované z hostitelského organismu pak mohou být použity přímo k předběžným metabolickým testům. Takto byl exprimován systém sestávající z lidského cytochromu P450 a potkaní reduktasy [84] a poté následovaly systémy s lidskými formami obou proteinů [85].

Byly provedeny i pokusy o fúzní spojení reduktasy se savčími cytochromy P450 ve snaze zvýšit aktivitu celého systému při přeměně substrátu. Tato idea vznikl pozorováním bakteriálního fúzního proteinu CYP102A1, který je jedním z nejvíce aktivních známých cytochromů P450. Fúzní systém lidského CYP3A4 s potkaní reduktasou ale v přítomnosti mikrosomálních fosfolipidů (nutných pro jeho funkci) nevykázal zvýšenou aktivitu [86], stejně jako další konstrukt s CYP1A1 [87].

### 1.5.1 Heterologní exprese lidského CYP1A1

Aktivní cytochrom P450 1A1 byl poprvé heterologně exprimován v bakteriích *E. coli* kmene DH5 $\alpha$  za pomoci plasmidu pCW. Jeho sekvence byla upravena výměnou první aminokyseliny leucin za alanin a úpravou dalších sedmi kodonů 5'-konce cDNA zavedením „tichých mutací“ sloužících proti tvorbě vlásenek mRNA. Tyto změny byly provedeny, protože pokusy s nativní sekvencí CYP1A1 vedly k nedetekovatelné indukci. Upravená forma poskytla protein v množství 25 nmol na litr kultury. Sekvenační analýza prokázala odstranění iniciačního N-formylmethioninu bakteriálními mechanismy, přičemž toto zkrácení protein exprimovaný u člověka nepodstupuje [88].

Stejně mutovaný CYP1A1 byl, narozdíl od jiných cytochromů P450, úspěšně exprimován do periplasmatického prostoru a to ve vysokém výtěžku. S využitím buněk DH5 $\alpha$ F', plasmidu pLIQ (nesoucím promotor *phoA*) a fúze proteinu se sekrečním signálem pro alkalickou fosfátasu bylo dosaženo výtěžku 4500 nmol na litr kultury. Takto exprimovaný protein je navíc zbaven signálního peptidu. Vysoká úspěšnost exprese

CYP1A1 v tomto kompartmentu je připisována periplasmatické lokalizaci významné části aparátu inkorporujícího hem do vzniklých hemoproteinů [89].

### 1.5.2 Heterologní exprese CYP1A2

Tento protein byl poprvé exprimován podobným způsobem, jako většina savčích cytochromů P450. Byla provedena záměna dvaceti N-koncových aminokyselin proteinu za sedm N-koncových aminokyselin hovězího CYP17A1 a protein byl za pomoci plasmidu pCW exprimován v bakteriích *E. coli* kmene DH5 $\alpha$ . Výtěžek dosáhl 700 nmol na litr média [90]. Stejně upravený gen byl podroben pokusům s koexpresí chaperonů Hsp40 a Hsp70, při kterých vzrostl výtěžek přibližně třikrát [91,92].

CYP1A2 s modifikovaným N-koncem se nedařilo sekvenovat Edmanovým odbouráváním, pokud nebyl protein podroben slabé kyselé hydrolýze, což naznačuje, že iniciační N-formylmethionin není při bakteriální produkci, na rozdíl od lidské, odštěpován [93].

Popsané blokování N-terminální aminokyseliny se projevuje také u dalších cytochromů P450 exprimovaných díky plasmidu pCW a s náhradou vlastního N-konce za sekvenci CYP17A1. Mutacemi této části na počátku DNA sekvence byly získány další varianty proteinu se zcela nebo částečně odštěpeným iniciačním methioninem, což ukazuje tabulka 5 [94]. Takto upravené proteiny mají ale sníženou aktivitu k markerovým substrátům a mutace pravděpodobně zasahují přímo do přenosu elektronů z partnerského proteinu na CYP1A2 [95].

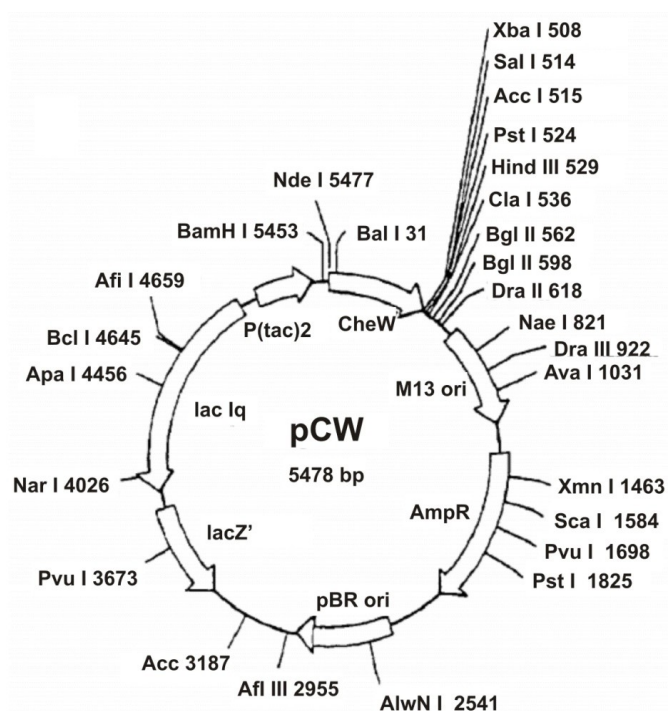
**Tab. 5 Charakterizace dalších variant CYP1A2 s mutovanou N-sekvencí exprimovaných v *E. coli*; převzato z [94].**

Varianta CYP1A2	N-koncová sekvence proteinu	Blokování N-konce proti Edmanově sekvenaci	Úroveň exprese nmol/l
1A2a	MARERAVFL	Ne	250
1A2b	MAVDSAVFL	Ne	850
1A2c	MAWRHAVFL	80 % blokováno	540

CYP1A2 bez N-koncové modifikace byl exprimován s použitím plasmidu pCW v buňkách kmene DH5 $\alpha$ F' s histidinovou značkou připojenou na C-konci proteinu. Oproti modifikovaným formám je tento protein aktivnější [96].

### 1.5.3 Plasmid pCW

Tento plasmid byl použit při mnoha expresích cytochromů P450 v bakterii *E. coli* [97]. Plasmid pCW byl původně vytvořen vložením bakteriálního genu CheW (odtud plasmid získal své jméno) do parentálního plasmidu pHSE5. Samotný gen CheW kóduje kontrolní protein bakteriální kinasy CheA [98]. Restrikční mapu plasmidu pCW ukazuje obrázek 8.



Obr. 8 Mapa plasmidu pCW; převzato z [99].

Plasmid obsahuje následující komponenty:

- *tac* promotor – hybridní promotor vzniklý fúzí částí sekvencí promotorů *lacUV5* a *trp*, který je nezávislý na regulaci cAMP a zajišťuje silnější expresi než promotor *lac* [100]. Původně byly v parentálním plasmidu vloženy čtyři promotory *tac*, dva z nich ale podlehlly spontánní delecí. V sekvenci za promotory se nachází iniciační oblast transkripce, která je odvozena z genu pro lysozym bakteriofága T4, což byl gen, pro který byl parentální plasmid pHSE5 původně navržen [101].
- *lacUV5* promotor – jedná se o mutovaný *lac* promotor, který není závislý na přítomnosti cAMP [102]. Ačkoliv se tento promotor v některých popisech plasmidu pCW nenachází, jeho přítomnost je popsána v publikaci popisující přípravu

parentálního plasmidu pHSE5 [101] a také byl nalezen v sekvenci získané sekvenací DNA. Nachází se mezi *tac* promotory a genem *lac Iq*.

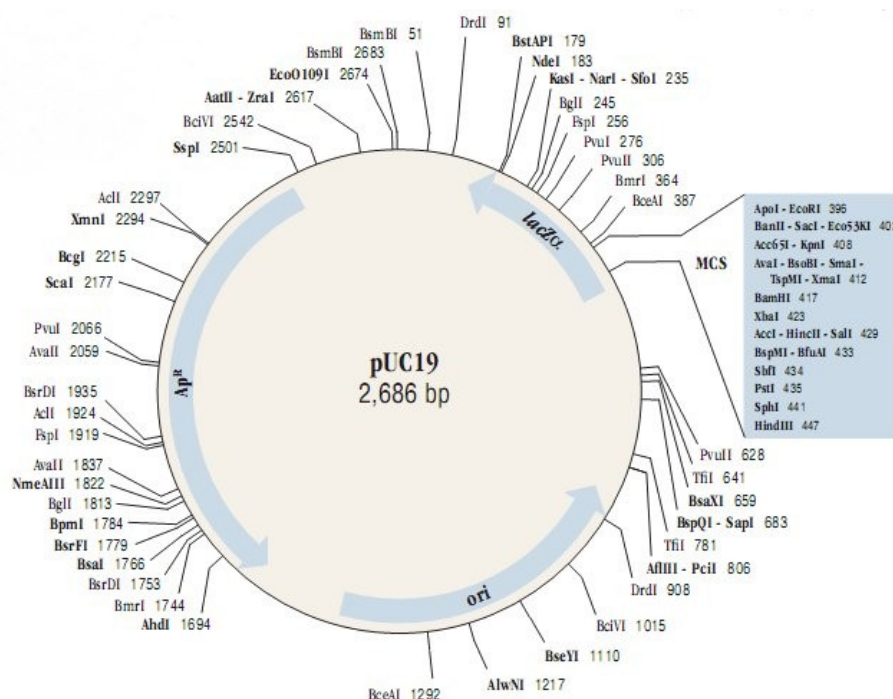
- terminační sekvence – kvůli síle původních čtyř *tac* promotorů byla použita sekvence silného *trp* transkripčního terminátoru. Ta se nachází mezi dvěma restričními místy pro restriční endonukleasy Bgl II [101].
- CheW – tento gen byl vložen do původního plasmidu pHSE5 v práci týkající se přípravy plasmidu pCW [98]. Při přípravě plasmidu pro expresi jiného proteinu je nahrazován jinou sekvencí DNA.
- M13 ori – replikon bakteriofága M13 slouží v případě přidání pomocného bakteriofága k produkci jednovláknové DNA [103]. Takto získaná jednovláknová DNA může být použita k místně-cílené mutagenezi či k sekvenaci [101].
- AmpR – gen kódující periplasmatický enzym  $\beta$ -laktamasu. Přítomnost tohoto enzymu působí jako selekční element, protože enzym hydrolyzuje cyklickou amidovou vazbu antibiotika ampicilin a bakterie s plasmidem kódujícím tento protein jsou tak schopné přežít právě v přítomnosti ampicilinu [103].
- pBR ori – typ replikonu neboli počátku replikace plasmidu zajišťující kopírování plasmidu v hostitelské buňce. Plasmid pCW je nízkokopiový plasmid, za což odpovídá přítomnost replikonu pMB1, replikonu plasmidů typu pBR [104]. Plasmidy s tímto promotorem dosahují 15-20 kopií v jedné hostitelské buňce.
- *lacZ'* – sekvence kódující úsek prvních 146 aminokyselin  $\beta$ -galaktosidasy ( $\alpha$ -fragment). Pokud je plasmid vnesen do buněk takového kmene *Escherichia coli*, které exprimují fragment  $\beta$ -galaktosidasy bez prvních 146 aminokyselin ( $\omega$ -fragment), dojde k tzv.  $\alpha$ -komplementaci obou samostatně neaktivních fragmentů za vzniku aktivního proteinu. Jeho aktivitu lze využít pro štěpení modrého substrátu X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid). Ty bakterie, které přijmou plasmid, zůstanou bílé na rozdíl od modrých, které postrádají aktivní enzym [103].
- polylinker – sekvence obsahující velké množství štěpících míst pro restriční endonukleasy se nachází za sekvencí genu CheW a je již částečně odbourána vložením tohoto genu pomocí štěpících míst pro restriční endonukleasy Nde I a Xba I.

- *lac Iq* – mutovaná forma genu pro *lac* represor, která je syntetizována přibližně v desetinásobně větším množství než „divoký typ“ *lac* represoru [105].

Dokud nejsou buňky indukovány vhodným induktorem, zůstávají *tac* promotory pod kontrolou konstitutivně silně exprimovaného *lac* represoru, který efektivně zabraňuje expresi. Po přidání induktoru, kterými jsou například laktosa nebo IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktosid) je represor odstraněn a začne probíhat exprese. Výhodou IPTG je, že nemůže být metabolizován a jeho koncentrace se tak nesnižuje.

### 1.5.4 Klonovací plasmid pUC19

Tento vysokokopiový plasmid byl v této práci použit pro získání většího množství plasmidové DNA pro další manipulace. Obrázek 9 ukazuje restrikční mapu plasmidu.



Obr. 9 Restrikční mapa plasmidu pUC19; převzato z [106].

Plasmid je pojmenován dle University of California, místa svého vzniku. Jedná se o malý vysokokopiový plasmid nesoucí pouze gen pro  $\beta$ -laktamasu zajišťující resistenci proti ampicilinu a dále  $\alpha$ -fragment  $\beta$ -galaktosidasy pro screening bakteriálních kolonií pomocí substrátu X-gal [107].

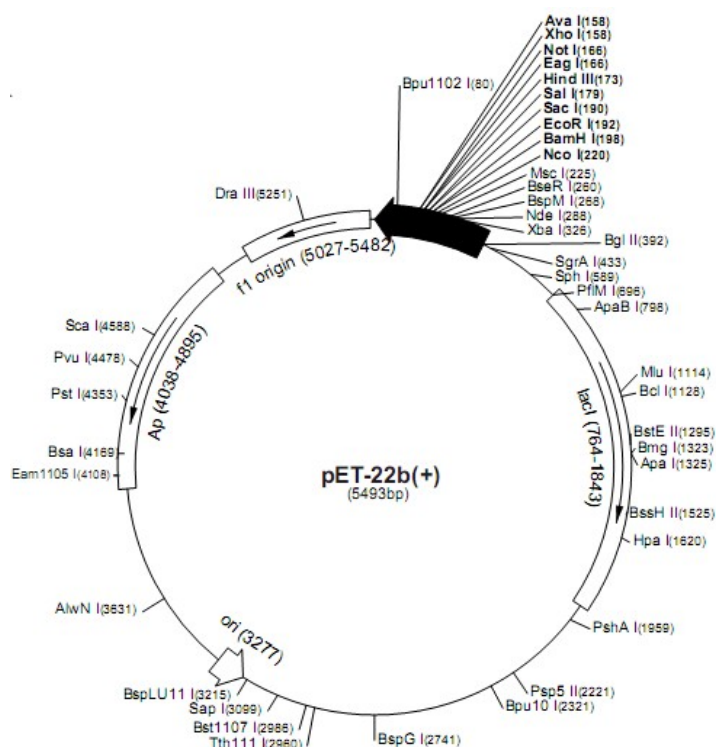
Vlastnost plasmidů rodiny pUC poskytovat vysoké výtěžky DNA leží v jejich replikonu. Tím je pMB1 obsažený i v nízkokopiovém plasmidu pCW, avšak u plasmidů pUC nese bodovou mutaci, která zabraňuje regulaci jeho replikace. Počet kopií v jedné buňce se pohybuje od 500 do 700 kusů při růstové teplotě 37 °C až 42 °C. V případě tak vysokokopiového plasmidu dochází k problému se selektivním působením ampicilinu, protože velkého množství exprimované  $\beta$ -laktamasy se bakteriální buňka zbavuje sekrecí do okolí. Kolonie transformovaných buněk tak okolo sebe může vytvářet „bezpečnou zónu“ pro buňky postrádající resistenci. Proto se někdy k selekci používá příbuzný karbenicilin, který je proti působení  $\beta$ -laktamasy odolnější [103].

### 1.5.5 Plasmid pET-22b

Jedná se o expresní plasmid a v této práci byl použit k expresním experimentům. Restrikční mapa plasmidu je zobrazena na obrázku 10.

Zobrazený plasmid patří do skupiny plasmidů využívajících T7 expresní systém („plasmids for expression by T7 RNA polymerase“). Tento systém byl vytvořen s nadějí na zvýšení efektivity translace cílových proteinů s využitím RNA polymerasy bakteriofága T7 [108]. Jejím výzkumem bylo zjištěno, že je asi pětikrát rychlejší než RNA polymerasa bakterie *Escherichia coli* [109] a nerozeznává většinu promotorů cizích hostitelských organismů. Expresní systém tedy sestává ze dvou hlavních částí a to z T7 RNA polymerasy a T7 promotoru.

Promotor z bakteriofága T7 musí být umístěn v DNA sekvenci transformovaného vektoru. Cílový gen je pak umístěn pod kontrolou tohoto promotoru a je po indukci rozpoznáván RNA polymerasou.



**Obr. 10** Restrikční mapa plasmidu pET-22b; převzato z [110].

Jelikož ale genom bakterie *Escherichia coli* neobsahuje gen pro T7 RNA polymerasu, jsou pro expresi využívány kmeny s již vneseným genem. Ten může být vnesen pomocí jiného plasmidu nebo pomocí bakteriofága DE3 inkorporován přímo do genomu *E. coli*. Takto vnesený fragment obsahuje i promotor *lacUV5* kontrolující expresi T7 RNA polymerasy, a gen *lacI* (*lac* represor) kontrolující naopak tento promotor [111]. Samotná T7 RNA polymerasa je v *E. coli* velmi úspěšně exprimována v aktivní formě [112].

Před indukcí je promotor *lacUV5* pod kontrolou represoru. Po přidání induktoru je represor odstraněn a je exprimována T7 RNA polymerasa. Ta následně nasedne na T7 promotor, který je obsažen v transformovaném vektoru a kontroluje expresi cílového proteinu. Díky rychlosti RNA polymerasy z bakteriofága T7 dojde k masivní produkci, což může mít za následek vznik inkluzních tělísek [113].

Použitý plasmid pET-22b nese replikon z plasmidu pBR322 a je proto nízkokopiový. Dále disponuje genem kódujícím  $\beta$ -laktamasu a tím uděluje transformovaným buňkám rezistenci proti ampicilinu a příbuzným antibiotikům.

## 2. Cíle diplomové práce

Primárním cílem práce bylo pomocí heterologní exprese připravit a izolovat lidské orthology cytochromů P450 1A1 a 1A2 potřebné pro provádění metabolických studií a pro studium jejich interakcí s NADPH: cytochrom P450 oxidoreduktasou a s cytochromem b<sub>5</sub>. Dílčími cíli pak bylo nejprve namnožit a osekvenovat získané blíže nespecifikované plasmidy nesoucí modifikované geny pro cytochromy P450 1A1 a 1A2. Na základě výsledků analýz pak geny upravit tak, aby jejich produkty pokud možno co nejvíce odpovídaly přirozeným lidským proteinům. A pak takto upravené geny vložit do vektorů založených na plasmidech pUC19 (klonovací) a pET22b (expresní) používaných v laboratoři a připravené konstrukty pak ověřit. Dále provést optimalizaci a porovnání exprese zmíněných proteinů ve vybraných kmenech *E. coli* s důrazem na maximalizaci výtěžku proteinu vázaného v bakteriální membráně. Finálně pak oba proteiny izolovat v čistotě vhodné pro provádění metabolických a pro studium protein-protein interakcí.



### 3. Materiál a metody

#### 3.1 Použité přístroje

Analytické váhy	40 SM-200A, Pesa HM-200, A&D Instruments LTD.
Vodní lázeň	Julabo TW2, Biotech
Předvážky	440-35-N, Kern EW 600-2M, Kern EK-600H, A&D Instruments LTD.
Centrifuga	5415 D/R, Eppendorf Allegro X-22R, Beckman Coulter (rotory 4250 a 630) Janetzki K70D, MLW Stolní minicentrifuga, Labnet Stolní minicentrifuga Gilson, GmC Lab
Ultracentrifuga	Beckman LE-80K, Beckman Coulter
Spektrofotometr	Spekol 11, CARLZEISS, Jena Diod Array 8453, Hewllet-Packard Helios $\alpha$ , Thermo Spectronic NanoVue Plus Spectrophotometer, GE Healthcare
Laminární box	BIO 126, Labox
Zdroj pro elektroforesu	EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Amerham Pharmacia Biotech
Termocycler	Tech gene, TECHNE
Transiluminátor	Dark Reader, Clare Chemical Research
Bezdotykový kahan	Gasprofí2 SCS, VLD-TEC
Inkubátor	IR 1500 Automatic CO2 Incubator, Flow Laboratories
Třepačka	ORBI-SAFE TS Net Wise, Gallenkamp
Autokláv	Varioklav 400E, H+P Labortechnik
Fotoaparát	DMC-LS65, Panasonic

Ohřívač bloků	LS1, VLM GmbH
Sběrač frakcí	model 2128, Bio-Rad
Homogenizátor	Dle Pottera a Elvehjema
Peristaltická pumpa	PP-05, Laboratorní přístroje Praha
Ultrafiltrační cela	Amicon, Millipore
Elektroforetická aparatura	MSMINI 10-Multi Sub Mini, Uvitec miniVE Vertical, Amersham Biosciences
Ultrazvuková sonda	Sonopuls HD 3100, Bandelin

### 3.2 Použitý materiál a chemikálie

Použité chemikálie pocházely z těchto zdrojů:

<b>Bio-Rad</b> <b>USA</b>	hydroxylapatit
<b>East Port</b> <b>ČR</b>	Oligonukleotidy, dinukleotidtrifosfáty
<b>Erba Lachema</b> <b>ČR</b>	bromfenolová modř, ethanol, octan sodný, dithioničitan sodný, EDTANa <sub>2</sub> (chelaton 3), hydroxid draselný, persíran amonný, chlorid draselný, kyselina chlorovodíková
<b>Fermentas</b> <b>Kanada</b>	Pfu DNA polymerasa (+ pufr, + 25 mM MgSO <sub>4</sub> ), 2-Log DNA marker, λ DNA/EcoRI + HindIII marker
<b>Fluka</b> <b>Švýcarsko</b>	akrylamid, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), dodecylsulfát sodný, Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Base), 2-merkapt ethanol, lysozym z vaječného bílku
<b>GeneAid</b> <b>Čínská republika</b>	GeneAid Plasmid Maxi Kit
<b>Genomed</b> <b>Německo</b>	JET quick-Plasmid Miniprep Spin Kit JET quick-Gel Extraction Spin Kit

<b>Invitrogen</b> <b>USA</b>	SYBR Safe™ DNA Gel Stain
<b>Lachema</b> <b>ČR</b>	citrát železitý, chlorid zinečnatý, chlorid kobaltnatý hexahydrát, molybdenan sodný dihydrát, chlorid vápenatý, chlorid měďnatý dihydrát, kyselina boritá
<b>Linde</b> <b>ČR</b>	dusík (g), oxid uhelnatý
<b>Penta</b> <b>ČR</b>	methanol, glycin
<b>Pharmacia</b> <b>Švédsko</b>	DEAE Sepharosa CL-6B, CM Sepharosa CL-6B
<b>Roche</b> <b>Švýcarsko</b>	Inhibitory proteas v tabletách cOmplete mini
<b>Sevapharma</b> <b>ČR</b>	hovězí sérový albumin (BSA)
<b>SERVA Electrophoresis</b> <b>Německo</b>	Coomassie Brilliant Blue R-250, ampicilin (sodná sůl), IPTG, TEMED, Triton X-100 [polyethylene glycol p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl ether]
<b>Sigma-Aldrich</b> <b>USA</b>	GenElute™ Plasmid Midiprep Kit, Luria Broth, Terrific Broth (modified), DMSO, DTT, cholát sodný, Luria Agar, $\alpha$ -naftoflavon

- blíže nespecifikované plasmidy nesoucí modifikované geny pro lidské cytochromy P450 1A1 a 1A2 byly získány darem od prof. Petera Guengeriche z Vanderbilt university v Nashville (USA).
- plasmidy pUC19 a pET-22b byly získány od RNDr. Marka Ingra, Ph.D.
- králíčí CYP1A2 byl izolován RNDr. Věrou Černou, Ph.D. na katedře biochemie Přírodovědecké fakulty UK.

Použité kmeny bakterie *Escherichia Coli* a jejich vlastnosti shrnuje tabulka 6.

**Tab. 6 Použité bakteriální kmeny *E. coli***

Kmen	Využití	Poskytl/Firma
DH5α	Klonování plasmidů, expresní kmen pro vektory odvozené od pCW	RNDr. Marek Ingr, Ph.D.
BL21-Gold (DE3)	Expresní kmen vektorů odvozených od pET-22B	Stratagene (USA)
BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL	Expresní kmen vektorů odvozených od pET-22B	Stratagene (USA)
BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	Expresní kmen vektorů odvozených od pET-22B	Stratagene (USA)
OverExpress C41(DE3)	Expresní kmen vektorů odvozených od pET-22B	Lucigen (USA)
OverExpress C43(DE3)	Expresní kmen vektorů odvozených od pET-22B	Lucigen (USA)

### 3.3 Metody

#### 3.3.1 Příprava agarových ploten s ampicilinem

Sterilní agar byl připraven rozpuštěním 4 g agaru ve 100 ml vody a sterilizován autoklávováním při 121 °C po dobu 20 minut. Před použitím byl rozehrán v mikrovlnné troubě a potřebné množství bylo odlito do zkumavky Falcon (50 ml). Po zchladnutí byl do agaru přidán ampicilin do výsledné koncentrace 100 µg/ml, směs byla promíchána a do sterilní Petriho misky bylo nalito přibližně 10 ml. Misky byly do ztuhnutí agaru ponechány na vodorovném povrchu v laboratorní teplotě.

#### 3.3.2 Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli*

Při přípravě byla využita metoda s využitím chloridu vápenatého [114] s drobnými modifikacemi. Tímto způsobem byly připraveny kompetentní buňky *E. coli* kmenů DH5α, C41 (DE3) a C43 (DE3). Veškeré centrifugační kroky byly provedeny s využitím centrifugy Allegro X-22R s rotorem 4250 a bylo pracováno v laminárním boxu.

Z mikrozkušavky Eppendorf obsahující zásobní suspenzi *E. coli* bylo odpipetováno 200 µl do Erlenmayerovy baňky (500 ml) se 100 ml LB média bez

antibiotika. Následně byly buňky inkubovány ve třepačce při 37 °C a 220 RPM, přičemž byla průběžně měřena jejich optická densita v LB médiu při 600 nm proti samotnému LB médiu. Když hodnota optické density dosáhla rozmezí 0,4 – 0,6, byly buňky přeneseny do dvou zkumavek Falcon (50 ml) a ponechány 10 minut v ledové tříšti. Následovala centrifugace obou zkumavek po dobu 10 minut při 4000 RPM a 4 °C, po které bylo LB médium odstraněno odlitím a ponecháním zkumavek 2 minuty v obrácené poloze na buničině. Po této době bylo do obou zkumavek přidáno 10 ml vychlazeného 100 mM chloridu vápenatého, ve kterém byly buňky resuspendovány špičkou a následně ponechány po dobu 10 minut v ledové tříšti. Pak byly zkumavky opět centrifugovány při 4000 RPM a 4°C po 10 minut. Supernatant byl odstraněn odlitím a postavením zkumavek do obrácené polohy na buničinu. K oběma peletám byly přidány 2 ml vychlazeného 100 mM chloridu vápenatého, pelety byly resuspendovány špičkou a ponechány v ledové tříšti 2-6 hodin. Po této inkubaci byly do každé zkumavky Falcon přidány 2 ml 50% glycerolu. Nakonec byly do 1,5 ml mikrozkušavek Eppendorf pipetovány alikvoty o objemu 200 µl, které byly uloženy do -80 °C.

### 3.3.3 Transformace buněk *Escherichia coli*

Tento postup byl využit při transformaci plasmidem i ligační směsí.

Kompetentní buňky *E. coli* a vektor byly vyjmuty z mrazáku a ponechány rozmraznout v ledové lázni. Pak bylo z alikvoty *E. coli* o objemu 200 µl odebráno 100 µl buněk do nové mikrozkušavky Eppendorf. Do jedné mikrozkušavky bylo přidáno 0,5-2 µl plasmidu (případně 20 µl ligační směsi), do druhé bylo dáno stejné množství sterilní MQ vody jako kontrola. Obě směsi byly jemně promíchány špičkou pipety bez nasátí a ponechány 30 minut v ledové lázni. Poté byly obě mikrozkušavky vloženy do předeřáté vodní lázně (Julabo TW2) o teplotě 42 °C. V případě buněk *E. coli* kmene DH5α byly mikrozkušavky v lázni ponechány po 90 sekund, v případě expresních kmenů 25 sekund. Po vyjmutí z lázně byly ponechány 2 minuty v ledové lázni.

K transformovaným i kontrolním buňkám bylo napipetováno 300 µl LB média bez ampicilinu (trojnásobek původního objemu buněk), obě suspenze byly inkubovány hodinu při 37 °C a následně byly napipetovány na agarovou plotnu s ampicilinem a rozetřeny sterilní hokejkou. Plotny byly po vsáknutí suspenze obráceny dnem vzhůru a inkubovány v 37 °C přes noc v inkubátoru.

### 3.3.4 Přeočkování bakteriálních buněk metodou „single-cell“

Druhý den byly vybrané kolonie transformovaných buněk přeočkovány z agarové plotny s ampicilinem do LB média s ampicilinem. Práce byla provedena v laminárním boxu.

V plameni bezdotykového kahanu byla vyžíhána pinzeta a následně s ní bylo uchopeno sterilní párátka. Jeho špičkou byla napíchnuta vybraná kolonie z agarové plotny a párátka bylo vhozeno do zkumavky Falcon (50 ml) s 5-10 ml LB média s ampicilinem. Zkumavka s povoleným víčkem byla inkubována v třepačce přes noc při 37 °C a 220 RPM. Agarové plotny byly uzavřeny parafilmem a uloženy do lednice pro případné další použití.

Po nárůstu a vyjmutí buněk z třepačky bylo ze zkumavky Falcon odebráno 200 µl buněk do mikrozskumavky Eppendorf (0,5 ml) a uchováno v 15% glycerolu v mrazáku při -80 °C. Takto uskladněné alikvoty byly použity pro přípravu midipreparace či maxipreparace DNA, případně pro expresní experimenty.

### 3.3.5 Minipreparace DNA pomocí kitu JETquick-Plasmid Miniprep

#### Spin Kit

Složení roztoků tohoto komerčního kitu bylo zjištěno z bezpečnostních listů (MSDS „material safety data sheet“) poskytnutých firmou Genomed na internetu.

Z narostlé kultury (5 ml) ve zkumavce Falcon (50 ml) bylo pomocí vyžíhané pinzety odebráno párátka a suspenze byla centrifugována při 3901 g po dobu 5 minut (Allegro X-22R, rotor 4250) a supernatant byl odstraněn odlitím a ponecháním zkumavky Falcon v obrácené poloze na buničině po dobu 2 minut.

Dále bylo postupováno dle návodu ke zmíněnému kitu. K peletě bylo přidáno 250 µl roztoku G1 (50 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM EDTA, 100 µg/ml RNasa A), peleta byla resuspendována špičkou a přenesena do sterilní mikrozskumavky Eppendorf. Poté bylo přidáno 250 µl lyzačního roztoku G2 (200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)), směs byla několikrát promíchána převrácením a ponechána maximálně 5 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci bylo přidáno 350 µl neutralizačního roztoku G3 (obsahujícího guanidium hydrochlorid), směs byla opět promíchána převrácením a centrifugována při 16100g po dobu 10 minut. Supernatant byl pipetován na kolonku JETquick umístěnou ve

výrobce dodané sběrné mikrozkuhavce. Kolonka byly centrifugovány při 13400g po 1 minutu (centrifuga 5415 D/R). Eluovaný roztok byl odstraněn a na kolonku bylo aplikováno 500 µl roztoku G4 (obsahující Tris-HCl, pH 7,5 s NaCl, EDTA a ethanol). Poté byla centrifugována při 13400g po 1 minutu, eluovaný roztok byl odstraněn a kolonka byla centrifugována při 16100g po 1 minutu kvůli odstranění zbytků roztoku G4. Následně byla kolonka přenesena do sterilních mikrozkuhovek Eppendorf (1,5 ml), na její střed bylo napipetováno 60-75 µl sterilní MQ vody přehřáté na 65 °C a byla ponechána 1 minutu při laboratorní teplotě. DNA byla eluována centrifugací při 13400g po dobu 2 minut. Získaná DNA byla uchována v mrazáku při -20 °C.

Při většině minipreparací bylo postupováno dle návodu výrobce, při první minipreparaci nízkokopiových plasmidů 1A1/pCW a 1A2Nm/pCW bylo ale postupováno dle upraveného návodu pro získ koncentrovanějšího vzorku DNA. Kultury byly narostlé v 10 ml LB média a při samotné preparaci byl zdvojnásoben objem použitých roztoků G1, G2 a G3, zbytek preparace již postupoval dle návodu výrobce.

### 3.3.6 Midipreparace DNA pomocí kitu Gen Elute™ Plasmid Midiprep Kit

Složení roztoků tohoto komerčního kitu bylo zjištěno z bezpečnostních listů (MSDS „material safety data sheet“) poskytnutých firmou Sigma-Aldrich na internetu.

Pro přípravu kultury bylo použito 50 ml LB média s ampicilinem, které bylo zaočkováno transformovanými buňkami buď s použitím párátka, nebo zmrazeného alikvotu. Následně byla kultura inkubována v Erlenmayerově baňce (500 ml) ve třepačce při 37 °C a 220 RPM přes noc.

Druhý den byla změřena optická denzita buněk při 600 nm proti LB médiu. Na základě zjištěné optické denzity bylo k midipreparaci použito spočtené množství kultury dle vzorce v návodu výrobce:

$$V = \frac{80}{OD}$$

kde V značí objem užitý k midipreparaci a OD představuje optickou denzitu při 600 nm. Jelikož kultura ve většině případů dosáhla optické denzity okolo dvou, bylo k preparaci použito 40-45 ml. Pro centrifugační kroky byla použita centrifuga Allegro X-22R s rotory 4250 a 630.

Vypočtený objem kultury byl přenesen do zkumavky Falcon (50 ml) a centrifugován při 3901g po 10 minut. Supernatant byl odstraněn odlitím a ponecháním zkumavky v obrácené poloze. Do zkumavky bylo přidáno 1,2 ml resuspendačního roztoku (50 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, RNasa A), pelety byly resuspendovány špičkou a přeneseny do centrifugačních kyvet (30 ml). Následně bylo přidáno 1,2 ml lyzačního roztoku (obsahujícího NaOH a SDS), směs byla několikrát promíchána převrácením a ponechána 4 minuty v laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 1,6 ml neutralizačního roztoku (složení je utajeno výrobcem), směs byla promíchána převrácením a centrifugována při 15000g po dobu 15 minut.

Kolonka byla připravena vložením do dodané zachytávací zkumavky Falcon (15 ml) přidáním 3 ml roztoku na přípravu kolon (obsahujícího anorganickou bázi) a centrifugací při 3901g po dobu 2 minut. Byl odlit eluovaný roztok, na kolonku byl nanesen supernatant z centrifugované směsi a kolonka byla opět centrifugována při 3901g po dobu 2 minut. Následně byly do kolonky napipetovány 3 ml promývacího roztoku (obsahujícího Tris-HCl a NaCl) a byla provedena centrifugace při 3901g po dobu 5 minut. Eluovaný roztok byl odlit a zbytky promývacího roztoku byly odstraněny centrifugací při 3901g po dobu 2 minut. Poté byla kolonka umístěna do nové sterilní zkumavky Falcon (15 ml) a zachycená DNA byla eluována přidáním 1 ml sterilní MQ vody a centrifugací při 3901g po dobu 5 minut. Získaný roztok DNA byl alikvotován po 200  $\mu$ l a alikvoty byly uchovány v mrazáku při -20 °C a -80°C.

### 3.3.7 Maxipreparace DNA pomocí kitu GeneAid Plasmid Maxi Kit

Maxipreparací byly připraveny koncentrovanější vzorky jednoho z použitých plasmidů před dodáním kitu pro midipreparaci. Pro časovou náročnost maxipreparace byly větší množství plasmidů připravovány již jen midipreparací. Informace o složení jednotlivých roztoků se nepodařilo získat, neboť firma GeneAid neposkytuje bezpečnostní listy ke svým produktům.

Pro přípravu kultury bylo použito 100 ml LB média s ampicilinem, které bylo zaočkováno 200  $\mu$ l transformovaných buněk ze zmrazeného alikvotu. Následně byla kultura inkubována v Erlenmayerově baňce (500 ml) ve třepačce při 37 °C a 220 RPM přes noc.



Druhý den byla nejprve ekvilibrována kolona z kitu přidáním a samovolným protečením 10 ml PEQ pufru. Narostlá kultura byla rozdělena do dvou zkumavek Falcon (50 ml) a centrifugovány při 3901g po 15 minut. Supernatanty byly odstraněny odlitím a ponecháním zkumavky v obrácené poloze na buničině po 2 minuty. Do každé zkumavky bylo přidáno 5 ml roztoku PM1, buňky byly resuspendovány špičkou a obě resuspendované pelety byly přeneseny do centrifugačních kyvet (30 ml). Následně do každé bylo přidáno 5 ml lyzačního roztoku PM2, směs byla několikrát převrácena a na 3 minuty ponechána při laboratorní teplotě. Dále bylo přidáno 5 ml roztoku PM3, směs byla promíchána převrácením zkumavky a centrifugována při 10000g po dobu 20 minut. Supernatant byl nanesen na připravenou kolonu a ponechán samovolně protéct. Poté bylo na kolonu přidáno 30 ml promývacího roztoku PW. Po protečení byla kolona umístěna do čisté centrifugační kyvety (30 ml) a bylo na ni aplikováno 12 ml roztoku PEL k eluci DNA. Po jeho protečení bylo do zkumavky přidáno 9 ml ledově vychlazeného isopropanolu, směs byla zamíchána převrácením a centrifugována při 15000g ve 4°C po dobu 30 minut. Supernatant byl opět odstraněn odlitím a převrácením zkumavky na buničinu a poté byla usazená peleta promyta přidáním 5 ml 75% ethanolu. Směs byla podruhé centrifugována při 15000g a 4°C, tentokrát po dobu 10 minut. Po odebrání supernatantu byla peleta sušena 10 minut při laboratorní teplotě a rozpuštěna v 1 ml sterilní MQ vody.

Získaný roztok DNA byl rozdělen na alikvoty po 200 µl a ty byly uchovány v mrazáku při -20 °C a -80°C.

### 3.3.8 Izolace DNA z agarosového gelu pomocí kitu

Požadovaná DNA byla opatrně vyříznuta z gelu, přenesena do předem zvážené mikrozkušavky Eppendorf a zvážena na analytických vahách. Dále bylo postupováno dle návodu ke kitu JETquick-Gel Extraction Spin Kit.

Do zkumavky bylo přidáno spočtené množství roztoku L1 obsahujícího perchlorát sodný. Na každých 100 mg gelu bylo nutno přidat 300 µl roztoku. Zkušavka byla na 15 minut vložena do ohřívače bloků předehřátého na 50 °C, přičemž byla občas promíchána poklepáním na stěnu zkumavky. Po rozpuštění gelu byla směs pipetována na JETquick kolonu umístěnou v dodané přijímací mikrozkušavce Eppendorf a centrifugována při 13400g po 1 minutu. Eluovaný roztok byl odstraněn a na kolonku bylo nanášeno 500 µl

roztoku L1. Opět proběhla centrifugace při 13400g po 1 minutu a eluovaný roztok byl odstraněn. Poté bylo na kolonku nanášeno 500 µl roztoku L2 a proběhla další centrifugace při 13400g po 1 minutu. Eluovaný roztok byl opět odstraněn a kolonka byla centrifugována na 16100g po 1 minutu, aby se odstranily zbytky roztoku L2 (obsahuje Tris-HCl, pH 7,5, NaCl, EDTA a ethanol). Poté byla vložena do sterilní mikrozkušavky Eppendorf (1,5 ml), na střed kolonky bylo aplikováno 50 µl sterilní MQ vody přehřáté na 65 °C a po 1 minutě byla DNA eluována centrifugací při 13400g po dobu 2 minut.

### 3.3.9 Polymerasová řetězová reakce - PCR

Byly provedeny PCR upravující oba získané geny. V případě genu *CYP1A1* byl upraven pouze jeden z prvních kodónů a ke koncům genu byla připojena restriční místa, ale v případě genu *CYP1A2Nm* byla nahrazena kódující DNA sekvence 5'- konce a připojena restriční místa.

#### *CYP1A1*

Lyofilizované primery potřebné pro gen *CYP1A1* byly rozpuštěny ve vodě na 100 µM koncentraci. Poté bylo 10 µl těchto roztoků naředěno na 20 µM koncentraci. Takto připravený roztok sloužil jako zásobník k provedení PCR. Jako templát sloužil vektor 1A1/pCW. V provedené PCR byl upraven kodón pro prolin, čtvrtou aminokyselinu od 5'- konce. Také byla ke koncům genu připojena místa pro restriční endonukleasy EcoRI a NdeI (5'- konec) a XhoI a HindIII (3'- konec). Fragment byl po reakci přečištěn a izolován horizontální elektroforézou na agarose. Pro úpravu genu *CYP1A1* byly navrženy primery uvedené v tabulce 7.

**Tab. 7 Primery použité pro PCR upravující gen *CYP1A1***

Název	Sekvence
1A1-forward	5' -GAATTCATATGGCTTTTCCGATTTCAATGTCAGCAACGGAGTTTC -3'
1A1-reverse	5' -GTAAAGCTTCTCGAGTTAAGAGCGCAGCTGCATTTG -3'

Reakční směs pro PCR genu *CYP1A1* obsahovala:

- 1 µl templátu (cca 250 ng)
- 1 µl forward primeru

- 1  $\mu$ l reverse primeru
- 1  $\mu$ l směsi dinukleotidtrifosfátů (10 mM)
- 5  $\mu$ l pufru pro Pfu polymerasu (10x koncentrovaný)
- 0,5  $\mu$ l Pfu polymerasy
- Sterilní MQ voda (do celkového objemu 50  $\mu$ l)

Reakce probíhala v termocycleru, kde byly nastaveny následující podmínky:

### **30 cyklů**

- 94 °C 30 s : rozvolnění DNA
- 53 °C 30 s : nasednutí primerů
- 73 °C 2 min : polymerace

### **1 cyklus**

- 73 °C 8 min : dosyntetizování segmentů DNA
- 6 °C : do odebrání vzorků

## ***CYP1A2***

Lyofilizované primery potřebné pro úpravu získaného genu *CYP1A2Nm* byly rozpuštěny ve vodě na 100  $\mu$ M koncentraci. Poté bylo 10  $\mu$ l těchto roztoků naředěno na 20  $\mu$ M koncentraci. Takto připravený roztok sloužil jako zásobní k provedení PCR. Jako templát sloužil vektor 1A2Nm/pCW.

Pro úpravu genu *CYP1A2Nm* byly provedeny dvě následné PCR. V první reakci došlo na 5'- konci k nahrazení sekvence hovězího CYP17A1 upravenou DNA sekvencí kódující aminokyseliny lidského CYP1A2. Na 3'- konci genu byla přidána štěpící místa pro restrikční endonukleasy XhoI a HindIII. Během druhé reakce byla na 5'- konec přidána štěpící místa pro restrikční endonukleasy EcoRI a NdeI. Produkty první i druhé PCR byly přečišťovány a izolovány horizontální elektroforézou na agarose.

Pro úpravu genu CYP1A2Nm byly navrženy primery uvedené v tabulce 8.

**Tab. 8 Primery použité pro PCR upravující gen CYP1A2Nm**

Název	Sekvence
1A2Nm-for-1	5' – GACGAATTCATATGGCGCTGTCTCAGTCTGTTCCGTTCTCTGCGACCG AACTG –3'
1A2Nm-for-2	5' – TTCTCTGCGACCGAACTGCTGCTGGCGTCTGCGATCTTCTGCCTGGTA TTCTGGG –3'
1A2Nm-rev	5' – GTAAAGCTTCTCGAGTCAATTGATGGAGAACGGCA –3'

Složení reakční směsi pro první PCR genu CYP1A2 bylo upraveno dle [115] a směs obsahovala:

- 1 µl templátu (cca 35 ng plasmidové DNA)
- 1 µl forward primeru A
- 1 µl reverse primeru
- 1 µl směsi dinukleotidtrifosfátů (10 mM)
- 5 µl pufru pro Pfu polymerasu (10x koncentrovaný)
- 6 µl MgSO<sub>4</sub> (25 mM)
- 2 µl DMSO
- 0,5 µl Pfu polymerasy
- Sterilní MQ voda (do celkového objemu 50 µl)

Reakční směs pro druhou PCR genu CYP1A2 obsahovala:

- 1 µl produktu první PCR sloužícího jako templát
- 1 µl forward primeru B
- 1 µl reverse primeru
- 1 µl směsi dinukleotidtrifosfátů (10 mM)
- 5 µl pufru pro Pfu polymerasu (10x koncentrovaný)
- 6 µl MgSO<sub>4</sub> (25 mM)
- 2 µl DMSO

- 0,5 µl Pfu polymerasy
- Sterilní MQ voda (do celkového objemu 50 µl)

Obě reakce probíhaly v termocycleru, kde byly nastaveny následující podmínky:

#### **CYP1A2 – 1. PCR**

##### ***30 cyklů***

- 94 °C 30 s : rozvolnění DNA
- 50 °C 30 s : nasednutí primerů
- 73 °C 2 min : polymerace

##### ***1 cyklus***

- 73 °C 5 min : dosyntetizování segmentů DNA
- 6 °C : do odebrání vzorků

#### **CYP1A2 – 2. PCR**

##### ***30 cyklů***

- 94 °C 30 s : rozvolnění DNA
- 50 °C 30 s : nasednutí primerů
- 78 °C 2 min : polymerace

##### ***1 cyklus***

- 78 °C 5 min : dosyntetizování segmentů DNA
- 6 °C : do odebrání vzorků

### **3.3.10 Štěpení DNA pomocí endonukleas EcoRI a HindIII**

Pro ligaci genu *CYP1A2* nasyntetizovaných pomocí PCR do plasmidu pUC19 bylo nutné provést dvojité štěpení insertů i plasmidů pomocí endonukleas EcoRI (enzym pocházející z *Escherichia coli*) a HindIII (enzym pocházející z *Haemophilus influenzae*). Pomocí aplikace „Dougle Digest Finder“ firmy New England Biolabs [116] byly nalezeny vhodné podmínky pro štěpení jak touto dvojicí enzymů, tak i pro další štěpení popsaná v následujících kapitolách. Ačkoliv aplikace nedoporučila dvojité štěpení endonukleasami EcoRI a HindIII, byla použita optimalizace z Diplomové práce Mgr. Terezy Hálkové [117].

Ke štěpení insertu (*CYP1A2*) bylo použito

- 15 µl produktu 2. PCR (vyizolovaný z agarosového gelu)
- 2 µl pufru pro EcoRI (10x koncentrovaný)
- 1 µl EcoRI
- 2 µl HindIII

Ke štěpení plasmidu pUC19 bylo použito

- 6 µl pUC19
- 2 µl pufru pro EcoRI (10x koncentrovaný)
- 1 µl EcoRI
- 2 µl HindIII
- Sterilní voda do celkového objemu 20 µl

Jednotlivé složky byly pipetovány do mikrozkušavky Eppendorf (200 µl) a inkubovány ve 37 °C po 2 hodiny.

### 3.3.11 Štěpení DNA pomocí endonukleas XhoI a NdeI

Dvojité štěpení pomocí endonukleas NdeI (enzym pocházející z *Neisseria denitrificans*) a XhoI (enzym pocházející z *Xanthomonas holcicola*) bylo provedeno pro kontrolní štěpení získaných vektorů 1A2/pUC, 1A1/pUC, ligaci insertů z plasmidů pUC19 do plasmidu pET-22b a pro kontrolní štěpení takto získaných vektorů 1A2/pET a 1A1/pET. Endonukleasa XhoI potřebuje pro úspěšné štěpení dodání hovězího sérového albuminu.

Ke štěpení bylo použito

- 5-15 µl plasmidové DNA (podle koncentrace)
- 1 µl XhoI
- 1 µl NdeI
- 2 µl pufru NEB 4 (10x koncentrovaný)
- 0,2 µl BSA (100x koncentrovaný)
- Sterilní voda do celkového objemu 20 µl

Jednotlivé složky byly pipetovány do mikrozkušavky Eppendorf (200 µl) a inkubovány ve 37 °C po 4 hodiny.

### **3.3.12 Štěpení DNA pomocí endonukleas NdeI a HindIII**

Toto dvojité štěpení bylo provedeno pro ligaci insertu 1A1 získaného z PCR do plasmidu pUC19, který byl štěpen stejnou kombinací endonukleas. Stejná kombinace enzymů byla použita při ligaci a ověřování vektoru 1A2/pCW

Ke štěpení bylo použito

- 15 µl plasmidové DNA
- 1 µl HindIII
- 1 µl NdeI
- 2 µl pufru NEB 2 (10x koncentrovaný)
- Sterilní voda do celkového objemu 20 µl

Jednotlivé složky byly pipetovány do mikrozkušavky Eppendorf (200 µl) a inkubovány ve 37 °C po 4 hodiny.

### **3.3.13 Štěpení DNA pomocí endonukleasy NdeI**

Samotná endonukleasa NdeI byla použita pro ověření identity vektorů 1A1/pCW a 1A2Nm/pCW, jelikož plasmid 1A1/pCW disponuje dvěma vzdálenými štěpicími místy pro tento enzym a oba plasmidy jsou tak na agarosovém gelu snadno odlišitelné.

Ke štěpení bylo použito

- 10 µl plasmidové DNA
- 1 µl NdeI
- 2 µl pufru NEB 2 (10x koncentrovaný)
- Sterilní voda do celkového objemu 20 µl

Jednotlivé složky byly pipetovány do mikrozkušavky Eppendorf (200 µl) a inkubovány ve 37 °C po 2 hodiny.

### 3.3.14 Ligace

Ligace byla použita pro vložení insertů do příslušných klonovacích či expresních plasmidů. Vždy byla prováděna mezi fragmenty s přecházejícími komplementárními konci a vždy byla použita DNA ligasa z bakteriofága T4.

Ligační směs byla míchána do celkového objemu 20  $\mu$ l bez přidané sterilní vody, přičemž ve směsi byly 2  $\mu$ l pufru pro T4 DNA ligasu a 1  $\mu$ l samotné DNA ligasy. Objem štěpeného insertu a štěpeného plasmidu byl odlišný v každé samostatné ligaci, ale byl dodržován molární poměr insert:plasmid okolo 1,2:1.

Nejprve byla smíchána plasmidová DNA s insertem, vložena na 5 minut do 45° C do ohřívače bloků a následně ponechána 3 minuty na ledu, což sloužilo k rozrušení nežádoucích interakcí mezi komplementárními konci. Poté byl přidán pufr a DNA ligasa. Ligace probíhala při 16°C v termocycleru přes noc.

### 3.3.15 Příprava vzorků DNA na sekvenaci

Vektory 1A1/pCW a 1A2Nm/pCW, stejně jako vektory 1A2/pUC19 a 1A1/pUC19 byly sekvenovány v Laboratoři sekvenace DNA Univerzity Karlovy v Praze, Viničná 7. K sekvenaci byl použit 1 mg vektorové DNA (pCW), respektive 600 ng DNA (pUC19)

Použité primery uvádí tabulka 9.

**Tab. 9 Primery použité k sekvenaci DNA**

Název	Sekvence	Použití
pCW-förw	5'-GTTTTGCACCATTCGATG -3'	Forward primer pCW
pCW-rev	5'-CGTCTTCAAGCAGATCTG -3'	Reverse primer 1A1/pCW
M13F	5'- GTAAAACGACGGCCAGT -3'	Forward primer pUC19
M13R	5'- AACAGCTATGACCATG -3'	Reverse primer pUC19
pUC19FNdeI	5'- GTTGGCGGGTGTCTG -3'	Forward primer 1A1/pUC19

### 3.3.16 Horizontální agarosová elektroforéza DNA

Tato metoda byla prováděna za účelem přecistění a izolace určeného fragmentu DNA pro PCR či ligaci a dále jako kontrolní metoda po provedení dvojitého štěpení DNA.

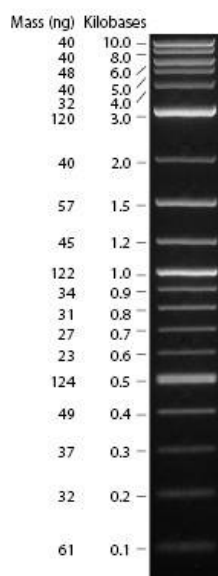


Byl připraven roztok 1% (w/v) agarosy ve 40 ml 1x koncentrovaného TAE pufru 0,04 M Tris-acetát; pH 8,2; 1 mM EDTA (zásobní roztok 50x koncentrovaný – 2 M Tris, 1 M kyselina octová, 50 mM EDTA). Agarosa byla rozpuštěna ohřevem v mikrovlnné troubě za občasného promíchání. Po ochlazení agarosy (přibližně na 40-45 °C) byly do roztoku přidány 4 µl barviva SYBR SAFE<sup>TM</sup> DNA gel Stain (10000x koncentrované). Roztok byl poté promíchán a nalit do elektroforetické vaničky a do gelu byl upevněn hřeben k vytvoření jamek pro nanášení vzorků. Po ztuhnutí gelu byl gel vyjmut a vanička s gelem byla umístěna do elektroforetické aparatury (MSMINI 10-Multi Sub Mini), která byla naplněna 1x TAE pufrem. Do jamek byly nanášeny vzorky zředěné 5x vzorkovým pufrem (roztok 40% sacharosy s 91% bromfenolovou modří). Do jedné z jamek bylo nanášeno i 6 µl roztoku markeru 2-log DNA Ladder. Elektroforéza probíhala 30-40 minut pod napětím 110 V.

Po ukončení elektroforézy byl gel umístěn na transiluminátor a přenesen do temné místnosti, kde byla DNA vizualizována. V případě potřeby byl gel vyfotografován.

### 3.3.17 Určení koncentrace a čistoty DNA

Pro potřeby ligace byla koncentrace odhadována z agarosového gelu pomocí složek markeru 2-Log DNA Ladder, který byl používán při horizontální agarosové elektroforéze. Podobu markeru na 1% agarosovém gelu s hodnotami hmotností jednotlivých složek [118] ukazuje obrázek 11.



Obr. 11 Marker 2-Log DNA Ladder; převzato z [118].

Pro potřeby sekvenace a měření koncentrace maxipreparace a midipreparací DNA bylo využito orientační stanovení koncentrace a čistoty spektrofotometrem NanoVue Plus. Ten byl nastaven na 0,5 mm délku optické dráhy a na DNA faktor 50. Na „vlasový kříž“ spektrofotometru bylo nejprve pipetováno 2 x 3  $\mu$ l MQ vody jako slepý vzorek, poté následovalo měření s 3  $\mu$ l vzorků. Byly získány hodnoty koncentrace, hodnoty absorbance v 230 nm, 260 nm, 280 nm a 320 nm, včetně poměrů absorbancí potřebných k predikci úspěšnosti sekvenace.

### 3.3.18 Elektroforéza SDS-PAGE

Použité roztoky:

**Pufr A:** 0,375 M Tris-HCl; 0,1% SDS (w/v); pH 8,8

**Pufr B:** 0,125 M Tris-HCl; 0,1% SDS (w/v); pH 6,8; 0,0006% bromfenolová modř

**Polymerační roztok A:** 30% akrylamid (w/v); 0,8% BIS (w/v) v pufru A

**Polymerační roztok B:** 30% akrylamid (w/v); 0,8% BIS (w/v) v pufru A

**Elektrodový pufr:** 0,025 M Tris-HCl; 0,192 M glycin; 0,1% SDS (w/v); pH 8,3

**Vzorkový redukující pufr (4x koncentrovaný):** 0,25 M Tris-HCl; 8% SDS (w/v); 40% glycerol (v/v); 20% 2-merkapt ethanol (v/v); 0,012% bromfenolová modř (w/v); pH 6,8

**Barvicí lázeň:** 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v); 46% ethanol (v/v); 9,2% kyselina octová (v/v)

**Odbarvovací lázeň:** 25% ethanol (v/v); 10% kyselina octová (v/v)

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného se používá k separaci proteinu na základě jejich molekulové hmotnosti [119].

Spodní 10% (w/v) separační gel byl připraven smícháním 5 ml pufru A, 2,5 ml polymeračního roztoku A, 7,5  $\mu$ l TEMEDu a 75  $\mu$ l persíranu amonného (100 mg/ml). Směs byla promíchána a pipetována mezi dvě skla oddělená spacery, která byla vertikálně umístěna v elektroforetické aparatuře (miniVE Vertical). Gel byl převrstven destilovanou vodou a ponechán po 30 minut tuhnout. Poté byla voda odlita.

Horní 4% (w/v) zaostřovací gel byl připraven smícháním 2,6 ml pufru B, 400  $\mu$ l polymeračního roztoku B, 3  $\mu$ l TEMEDu a 60  $\mu$ l persíranu amonného. Směs byla opět

krátce promíchána a pipetována na spodní separační gel. Po napipetování byl do tuhacího zaostřovacího gelu umístěn plastový hřeben k vytvoření jamek na vzorky. Byl použit 10-jamkový či 15-jamkový hřeben. Horní gel byl ponechán tuhnout asi 30 minut. Poté byl hřeben vyjmut, byl otevřen spodní těsnicí díl elektroforetické aparatury a aparatura byla umístěna do vaničky. Horní i spodní elektrodový prostor aparatury byl naplněn elektrodovým pufrem.

Vzorky byly smíchány s odpovídajícím množstvím 4x vzorkového redukujícího pufru a vody. Výsledné roztoky byly 5 minut povařeny, krátce centrifugovány a pomocí Hamiltonovy stříkačky nanášeny do jamek. Bylo nanášeno 10-15  $\mu\text{l}$  vzorku na jamku. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 80 V při průchodu zaostřovacím gelem (asi 30 minut) a poté bylo napětí nastaveno na 150 V. Průchod separačním gelem trval obvykle 90 minut.

Po ukončení elektroforézy byla skla vyjmuta z elektroforetické aparatury, byly odejmuty spacery a skla byla opatrně odlepena. Horní zaostřovací gel byl odstraněn a spodní separační gel byl vložen na 1 hodinu do barvicí lázně. Následně byl odbarvován v odbarvovací lázni, kde byl po dvou výměnách lázně asi po 2-3 hodinách dostatečně odbarven.

### 3.3.19 Stanovení koncentrace cytochromu P450

Do semimaskované kyvety bylo pipetováno dané množství vzorku a naředěno fosfátovým pufrem (100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2% (v/v) glycerol; pH 7,5) do 600  $\mu\text{l}$ . Směs byla promíchána a bylo změřeno její spektrum na spektrofotometru Diod Array 8453. Následně bylo do směsi přidáno několik krystalků dithioničitanu sodného, roztok byl promíchán a použit k proměření základní linie v rozsahu 400 až 500 nm. Roztok v kyvetě byl poté probubláván slabým proudem oxidu uhelnatého po dobu 60 sekund a následně bylo proměřeno jeho spektrum.

Koncentrace cytochromu P450 byla vypočtena dle rovnice

$$c_{P450} = \frac{A_{450} - A_{490}}{\epsilon_{P450}} \times \text{ředění} [\mu\text{M}]$$

kde

$c_{P450}$  – koncentrace cytochromu P450

$A_X$  – absorbance při vlnové délce  $X$

$\epsilon_{450}$  – molární absorpční koeficient cytochromu P450 ( $\epsilon = 0,091 \text{ } \mu\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ )

### 3.3.20 Kultivace buněk *E. coli* pro testovací expresi

Během experimentů byly upraveny doby a podmínky kultivace, stejně jako typ médií. Optimalizace jsou shrnuty v kapitole Výsledky. Popsaná metoda ukazuje obecný postup s jednotlivými expresními plasmidy.

Do zkušavky Falcon (50 ml) s 10 ml LB média s ampicilinem bylo pipetováno 100  $\mu\text{l}$  buněk ze zamraženého alikvotu či z kultury získané přeočkováním metodou „single-cell colony“. Zkušavka s povoleným víčkem byla následně inkubována ve třepačce při 37 °C a 220 RPM. Průběžně byla sledována optická denzita při 600 nm proti LB médiu. V případě jiné expresní teploty byla třepačka přenastavena již před dosažením požadované optické denzity. Po jejím dosažení byla exprese indukována zvoleným množstvím IPTG (1 M zásobní roztok) s přidavkem ALA (0,5 M zásobní roztok). Rychlost třepání byla snížena na 180 RPM a tato kultivace pokračovala dle zvoleného časového úseku. Kultivace byla zastavena sklizením buněk centrifugací při 3901g po dobu 15 minut v centrifuze Allegro X-22R.

### 3.3.21 Kultivace buněk *E. coli* ve větším množství média

Kultivace buněk ve větším objemu média, která je vhodná pro získání většího množství proteinu a samotnou izolaci, byla provedena s vektorem 1A1/pET a plasmidy odvozenými od pCW.

#### Vektor 1A1/pET

Do Erlenmayerovy láhve (2 l) s 250 ml LB média s ampicilinem bylo pipetováno 2,5 ml buněk z kultury získané přeočkováním metodou „single-cell colony“. Láhev byla inkubována v třepačce při 37 °C a 220 RPM. Průběžně byla sledována optická denzita při 600 nm proti LB médiu. Asi při optické denzitě 0,8 byla teplota snížena na 18 °C. Po nárůstu buněk do optické denzity 1 byla indukována exprese přidáním IPTG do 50  $\mu\text{M}$  koncentrace a byla též dodána kyselina  $\delta$ -aminolevulové do 0,5 mM koncentrace. Otáčky byly sníženy na 180 RPM a kultivace probíhala po následujících 24 hodin, kdy byla

zastavena sklizením buněk centrifugací při 3000 RPM po dobu 30 minut ve 4 °C (centrifuga Janetzki K70D). Buňky byly poté resuspendovány v 15 ml resuspendačního pufru (10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1 mM EDTA; pH 7,7)

### Vektory odvozené od pCW

Do Erlenmayerovy láhve (2 l) s 250 ml LB média či modifikovaného TB média s ampicilinem bylo pipetováno 2,5 ml buněk z kultury získané přeočkováním metodou „single-cell colony“. Láhev byla inkubována v třepačce při 37 °C a 220 RPM. Průběžně byla sledována optická denzita při 600 nm proti LB médiu nebo modifikovaného TB média. Při dosažení optické denzity 0,4 byla teplota ve třepačce snížena na 32 °C. Po nárůstu buněk do optické denzity 0,6 byla indukována exprese přidáním IPTG do 1 mM koncentrace a byla též dodána kyselina  $\delta$ -aminolevulová do 0,5 mM koncentrace. Otáčky byly sníženy na 180 RPM a kultivace probíhala po následujících 32 hodin, kdy byla zastavena zchlazením buněk ve 4 °C po 1 hodinu a následným sklizením buněk centrifugací při 3000 g po dobu 30 minut ve 4 °C.

Modifikace TB média zahrnovala nejen použití TB média s přídavkem fosforečnanů (již obsaženo v komerční směsi), ale byla dodána i další aditiva dle [96]. Aditiva zahrnovala:

- 50  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$
- 1 mM  $\text{MgCl}_2$
- 2,5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- roztok stopových prvků

Zmíněný roztok stopových prvků byl připraven jako 4000x koncentrovaný roztok dle [120] rozpuštěním následujících složek v malém množství sterilní vody v udaném pořadí:

- 2,45 g  $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7$  (citrát železitý)
- 10 ml koncentrované HCl
- 0,131 g  $\text{ZnCl}_2$
- 0,2 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

- 0,2 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- 0,075 g  $\text{CaCl}_2$
- 0,127 g  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,05 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$
- Sterilní voda do 100 ml

### 3.3.22 Příprava sferoplastů

V případě expresních experimentů s vyšším množstvím TB média a s vektory odvozenými od pCW byly při expresi určené k izolaci proteinu připraveny sferoplasty.

Buňky byly po centrifugaci (viz kapitola 3.3.21, oddíl Vektory odvozené od pCW) resuspendovány v TSE pufru (5 ml/100 ml bakteriální kultury – 100 mM Tris-acetát; pH 7,6; 500 mM sacharosa; 0,5 mM EDTA). Po resuspendaci bylo k buňkám přidáno 50 ml vychlazené destilované vody a následně byl přidán lysozym do koncentrace 0,2 mg/ml (byl použit alikvot 20 mg enzymu v 1 ml vody). Směs byla poté hodinu míchána ve 4°C. Po uplynutí stanovené doby byla směs centrifugována při 3000g po 25 minut ve 4 °C (Allegro X-22R) a sferoplasty byly resuspendovány v pufru (4 ml/100 ml bakteriální kultury – 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,6; 20% (v/v) glycerol; 0,1 mM DTT), ve kterém byla předtím rozpuštěna tableta proteasových inhibitorů.

### 3.3.23 Dezintegrace buněk *E. coli*

Dezintegrace byla provedena s použitím sonikátoru a to dvěma odlišnými způsoby. Většinou byly buňky naředěny resuspendačním pufrem na celkový objem 25 ml (10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1 mM EDTA; pH 7,7), byla k nim přidána tableta proteasových inhibitorů a za stálého chlazení byly sonikovány 5x90 sekund při 40% amplitudě. Dezintegrované buňky byly centrifugovány 10 minut při 3901 g a 4°C (Allegro X-22R, rotor 4250) pro zachycení pelety obsahující nerozbité buňky. Výsledný supernatant byl centrifugován po 20 minut při 18000 g a 4°C (Allegro X-22R, rotor 630) pro odstranění inkluzních tělísek. Z druhého supernatantu byla následně připravena membránová frakce.

V případě přípravy sferoplastů byly tyto buňky bez buněčné stěny resuspendované v pufru s již přidanou tabletou proteasových inhibitorů. Směs byla rozdělena do dvou zkumavek Falcon (50 ml) a sonikována 4x30 sekund za stálého chlazení při 40%

amplitudě. Dezintegrované sferoplasty byly centrifugovány 20 minut při 10000 g a 4°C (Allegro X-22R, rotor 630) pro zachycení pelety obsahující nerozbité sferoplasty a inkluzní tělíska. Ze supernatantu byla následně připravena membránová frakce.

### 3.3.24 Příprava membránové frakce

V případě dezintegrace buněk neošetřených lysozymem byla membránová frakce získána ultracentrifugací supernatantu (viz kapitola 3.3.23) při 265000 g a 4°C po dobu 75 minut (rotor Ti 70). Takto získané usazené membrány byly resuspendovány v 5-6 ml resuspendačního pufru (20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM EDTA; 20% (v/v) glycerol; pH 7,7) a zamraženy.

Pokud byly připravovány a dezintegrovány sferoplasty, byly membrány připraveny ultracentrifugací supernatantu při 180000 g a 4°C po dobu 75 minut. Membrány byly resuspendovány v 10 ml resuspendačního pufru (50 mM Tris-HCl; 20% (v/v) glycerol; 1 mM EDTA; pH 7,4) a ihned použity k solubilizaci proteinů.

### 3.3.25 Solubilizace proteinů z bakteriální membrány

Získané membrány byly naředěny na 25 ml resuspendačním pufrům (50 mM Tris-HCl; 20% (v/v) glycerol; 1 mM EDTA; pH 7,4). Následně bylo za stálého míchání a chlazení v ledové tříšti přikapáno 25 ml resuspendačního pufru, který navíc obsahoval detergenty Triton X-100 a cholát sodný a inhibitor  $\alpha$ -naftoflavon. V případě solubilizace membrán s cytochromem P450 1A1 dosahovalo množství obou látek takového množství, aby byla ve výsledné směsi přítomna 0,625 % koncentrace jak Tritonu X-100, tak cholátu sodného. Pokud byl solubilizován cytochrom P450 1A2, pak byla zachována koncentrace cholátu sodného, ale Triton X-100 byl přítomen ve finální 1,25 % koncentraci. Koncentrace  $\alpha$ -naftoflavonu v obou případech dosahovala 30  $\mu\text{M}$  koncentrace. Směs byla poté 2 hodiny míchána v kádince obklopené ledovou tříští v chladové místnosti a následně ultracentrifugována při 100000g po dobu 60 minut při 4°C.

### 3.3.26 Chromatografie na koloně DEAE Sepharosy CL-6B

Potřebné množství DEAE Sepharosy, uchovávané v 20% (v/v) ethanolu, bylo 3x promyto 250 ml destilované vody a rozmícháno v 200 ml cyklizačního pufru (1 M Tris-

HCl; pH 7,4) a ponecháno přes noc v lednici. Druhý den byl nosič promyt 3 x 250 ml destilované vody, rozmíchán v malém objemu ekvilibračního pufru a s pomocí skleněné tyčinky byl nalit do kolony, jejíž frita byla odplyněna ekvilibračním pufrem. Nosič byl ponechán sedimentovat alespoň 6 hodin.

Při izolaci CYP1A1 byl jako ekvilibrační pufr použit roztok o složení 50 mM Tris-HCl; 20% (v/v) glycerol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,4% cholát sodný; 0,4% Triton X-100, pH 7,4. Nosič byl poté promyt pufrem 50 mM Tris-HCl; 20% (v/v) glycerol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,4% cholát sodný; 100 mM KCl, pH 7,4. Následně byl nasazen gradient 100–700 mM KCl (2x 500 ml) v pufru 50 mM Tris-HCl; 20% (v/v) glycerol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,4% cholát sodný; pH 7,4.

Při první izolaci CYP1A2Nm byl jako ekvilibrační pufr použit 50 mM Tris-HCl; 20% (v/v) glycerol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; pH 7,4, kterým byl nosič promýván i po nanesení vzorku.

Při druhé izolaci CYP1A2Nm byl použit stejný ekvilibrační pufr jako v případě CYP1A1, tedy 50 mM Tris-HCl; 20% (v/v) glycerol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,4% cholát sodný; 0,4% Triton X-100; pH 7,4; kterým byl protein promýván i po nanesení vzorku. Nosič byl poté promyt pufrem 50 mM Tris-HCl; 20% (v/v) glycerol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,4% cholát sodný; 100 mM KCl; pH 7,4. Následně byl nasazen gradient 100–700 mM KCl (2x 500 ml) v pufru 50 mM Tris-HCl; 20% (v/v) glycerol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; pH 7,4.

Ve všech případech byl nosič nakonec promyt i roztokem o zvýšené iontové síle (1 M KCl v ekvilibračním pufru). Frakce obsahující hemoproteiny byly detekovány měřením absorbance při 410 nm. V případě první izolace CYP1A2Nm byly frakce spojeny a zředěny roztokem 20% (v/v) glycerolu; 1 mM EDTA a 1 mM DTT na celkový objem 100 ml a aplikovány na kolonu CM Sepharosy CL-6B. Při druhé izolaci byly frakce spojeny a zahuštěny na objem 2,4 ml, který byl poté nanesen na kolonu Sephadex G-100.

Nosič byl poté regenerován promýváním 250 ml 1 M KCl, 250 ml 1 M octanu sodného (pH 3,0), 250 ml destilované vody, 250 ml 0,5 M NaOH, 250 ml destilované vody, 250 ml 1 M octanu sodného (pH 3,0), 3 x 250 ml destilované vody a 2x 250 ml roztoku 20% (v/v) čistého ethanolu ve vodě. Následně byl nosič rozmíchán ve 200 ml roztoku 20% (v/v) ethanolu ve vodě.



### 3.3.27 Chromatografie na koloně CM Sepharosy CL-6B

Tato metoda byla použita při první provedené izolaci CYP1A2Nm pro přečištění frakcí získaných chromatografií na DEAE Sepharose CL-6B.

Při přípravě a regeneraci nosiče CM Sepharosy CL-6B bylo postupováno stejně jako u DEAE Sepharosy CL-6B (kapitola 3.3.26). Rozdíl byl v použitém cyklizačním pufru (1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 6,5) a ekvilibračním pufru (20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 20% (v/v) glycerol; 0,2 mM EDTA; 1 mM DTT; pH 6,5).

Na ekvilibrovanou kolonu byla nanесena zředěná frakce obsahující hemoprotein, které byly získány z kolony DEAE Sepharosy CL-6B během první izolace CYP1A2Nm a nosič byl dále promýván ekvilibračním pufrem. Frakce obsahující hemoproteiny byly detekovány měřením absorbance při 410 nm.

### 3.3.28 Chromatografie na koloně hydroxylapatitu

Tato metoda byla použita při první provedené izolaci CYP1A2Nm pro přečištění frakcí získaných chromatografií na CM Sepharose CL-6B. Bylo naváženo potřebné množství hydroxylapatitu (z 1 g suchého nosiče vznikne asi 2,5 ml suspenze), které bylo 3x promyto destilovanou vodou a ponecháno nabobtnat přes noc. Druhý den byl nosič 2x promyt 50 ml destilované vody a 2x v ekvilibračním pufru P1 (10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,05 mM EDTA; 20% (v/v) glycerol; 0,1 mM DTT; 0,05% (w/v) cholát sodný; pH 7,7) a nalit do kolony, kde byl po usednutí promyt 200 ml ekvilibračního pufru P1. Na kolonu byl aplikován zahuštěný vzorek získaný z CM Sepharosy CL-6B první izolace CYP1A2Nm a poté byla kolona promývána ekvilibračním pufrem, dokud nepoklesla absorbance při 280 nm pod 0,02. Poté byla kolona promyta 30 ml pufru P2 (300 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,05 mM EDTA; 20% (v/v) glycerol; 0,1 mM DTT; 0,05% (w/v) cholát sodný; pH 7,7) a 30 ml pufru P3 (500 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,05 mM EDTA; 20% (v/v) glycerol; 0,1 mM DTT; 0,05% (w/v) cholát sodný; pH 7,7). Následně byl nosič promýván elučním pufrem P4 (500 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,05 mM EDTA; 20% (v/v) glycerol; 0,1 mM DTT; 0,15% (w/v) cholát sodný; pH 7,7). Frakce obsahující hemoproteiny byly detekovány měřením absorbance při 410 nm a poté byly zahuštěny na objem 2 ml. Získaný preparát byl 2x dialyzován proti 500 ml dialyzačního pufru (100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,7; 20% (v/v) glycerol; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM DTT).

### 3.3.29 Chromatografie na koloně Sephadexu G-100

Tato metoda byla použita při druhé provedené izolaci pro přečištění frakcí získaných chromatografií na DEAE Sepharose CL-6B.

Potřebné množství nosiče Sephadex G-100, uchovávaného v 20% (v/v) ethanolu, bylo 3 x promyto 250 ml destilované vody a 250 ml ekvilibračního pufru (100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 20% (v/v) glycerol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,05% cholát sodný; pH 7,4). Následně byl v malém objemu tohoto ekvilibračního pufru rozmíchán a nalit do kolony, kde byl ponechán za pomalého promývání ekvilibračním pufrem ponechán přes noc sedimentovat. Na kolonu byla nanášena zahuštěná frakce obsahující hemoprotein, která byla získána elucí z kolony DEAE Sepharose CL-6B při druhé izolaci CYP1A2. Následně byl nosič promýván 500 ml ekvilibračního pufru a byly jímány frakce o objemu 5 ml. Frakce obsahující hemoproteiny byly detekovány měřením absorbance při 410 nm, následně byly spojeny a získaný preparát byl dialyzován proti 500 ml dialyzačního pufru (100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,4; 20% (v/v) glycerol; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT)

## 4. Výsledky

### 4.1 Příprava CYP1A1

#### 4.1.1 Charakterizace vektoru

Bližší necharakterizovaný konstrukt, získaný darem od prof. Guengeriche, nesoucí gen pro lidský cytochrom P450 1A1 v plasmidu odvozeném od pCW byl nejprve namnožen a izolován minipreparací DNA. Bylo získáno přibližně 18,7 ug plasmidové DNA o dostačující čistotě ( $A_{260}/A_{280} = 1,72$ ) a tento preparát byl následně sekvenován s použitím navržených primerů uvedených v metodách (kapitola 3.3.15)

Použitím „forward“ primeru bylo přečteno 737 a pomocí „reverse“ primeru 869 bází z genu *CYP1A1* (o délce 1539 bází). Byla také zachycena sekvence vektoru v okolí genu (promotory), která odpovídala plasmidu pCW (1x *lacUV5*, 2x *tac*). Sekvenci DNA a odpovídající sekvenci aminokyselin ukazuje obrázek 12.

a)

```
CCAGGCTTTACACTTTATGCTTCGGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAA
TTTCACACAGGAAACAGGATCGATCCATCGATGAGCTTACTCCCCATCCCCCTGTTGACAA
TTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAAC
AGGATCAGCTTACTCCCCATCCCCCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGG
AATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGGATCCATCGATGCTTAGGAGGTCAT
ATGGCTTTTCCAATTTCAATGTCAGCAACGGAGTTTCTTCTGGCCTCTGTCATCTTCTGTC
TGGTATTCTGGGTAATCAGGGCTCAAGACCTCAGGTCCCCAAAGGCCTGAAGAATCCACC
AGGGCCATGGGGCTGGCCTCTGATTGGGCACATGCTGACCCTGGGAAAGAACCCGCACCTG
GCACTGTCAAGGATGAGCCAGCAGTATGGGGACGTGCTGCAGATCCGAATTGGCTCCACAC
CCGTGGTGGTGTGCTGAGCGGCCTGGACACCATCCGGCAGGCCCTGGTGCAGGAGGCGATGA
TTTCAAGGGCCGGCCCGACCTCTACACCTTCACCCTCATCAGTAATGGTCAGAGCATGTCC
TTCAGCCCAGACTCTGGACCAGTGTGGGCTGCCCGCCGGCGCCTGGCCCAGAATGGCCTGA
AAAGTTTCTCCATTGCCTCTGACCCAGCCTCCTCAACCTCCTGCTACCTGGAAGAGCATGT
GAGCAAGGAGGCTGAGGTCCTGTTAAGCACGTTGCAGGAGCTGATGGCAGGGCCTGGGCAC
TTTAACCCCTACAGGTATGTGGTGGTATCAGTGACCAATGTCATCTGTGCCATTTGCTTTG
GCCGGCGCTATGACCACAACCACCAAGAACTGCTTAGCCTAGTCAACCTGAATAATAATTT
CGGGGAGGTGGTTGGCTCTGGAACCCAGCTGACTTCATCCCTATTCTTCGCTACCTACCC
AACCCTTCCCTGAATGCCTTCAAGGACCTGAATGAGAAGTTCTACAGTTTCATGCAGAAGA
TGGTCAAGGAGCACTACAAAACCTTTGAGAAGGGCCACATCCGGGACATCACAGACAGCCT
GATTGAGCACTGTGAGGAGAAGCAGCTGGATGAGAACGCCAATGTCCAGCTGTCAGATGAG
AAGATCATTAACATCGTCTTGGACCTCTTTGGAGCTGGGTTTGACACAGTCACAACCTGCTA
```

TCTCCTGGAGCCTCATGTATTTGGTGATGAACCCAGGGTACAGAGAAAGATCCAAGAGGA  
 GCTAGACACAGTGATTGGCAGGTCACGGCGGCCCCGGCTCTCTGACAGATCCCATCTGCCC  
 TATATGGAGGCCTTCATCCTGGAGACCTTCCGACACTCTTCCTTCGTCCCCTTCACCATCC  
 CCCACAGCACAACAAGAGACACAAGTTTGAAGGCTTTTACATCCCCAAGGGGCGTTGTGT  
 CTTTGTAAACCAGTGGCAGATCAACCATGACCAGAAGCTATGGGTCAACCCATCTGAGTTC  
 CTACCTGAACGGTTTCTCACCCCTGATGGTGCTATCGACAAGGTGTTAAGTGAGAAGGTGA  
 TTATCTTTGGCATGGGCAAGCGGAAGTGATCGGTGAGACCATTGCCCGCTGGGAGGTCTT  
 TCTCTTCCTGGCTATCCTGCTGCAACGGGTGGAATTCAGCGTGCCACTGGGCGTGAAGGTG  
 GACATGACCCCCATCTATGGGCTAACCATGAAGCATGCCTGCTGTGAGCACTTCCAAATGC  
 AGCTGCGCTCTTAGGTGCTTGAGAGCCCTGAGGCCTAGACTCTGTCTACCTGGTCTGGTTG  
 GGCAGCCAGACCAGCAGGCTGGCCTATGTGGTCTAAGGTTTACGCTGAACTCATAGACAC  
 TGATCTGGCTGCAGTTTGTCTATCTGGGCTGTGGGCAAGCCTAAGGGATCCTGCCTGCCAT  
ATGAC

b)

MAFPISMSATEFLLASVIFCLVFWVIRASRPQVPKGLKNPPGPWGWPLIGHMLTLG  
 KNPHLALSRMSQQYGDVLQIRIGSTPVVLSGLDITRQALVRQGDDFKGRPDLYTF  
 TLISNGQSMSFSPDSGPVWAARRRLAQNGLKSFSIASDPASSTSCYLEEHVSKEAE  
 VLLSTLQELMAGPGHFNRYRYVVSVTNVICAICFGRRYDHNHQELLSLVNLNN  
 FGEVVGSGNPADFIPLRYLPNPSLNAFKDLNEKFYSFMQKMVKEHYKTFEKGHIR  
 DITDSLIEHCQEKQLDENANVQLSDEKIINIVLDLFGAGFDTVTTAISWSLMYLV  
 NPRVQRKIQEELDTVIGRSRRPRLSDRSHLPYMEAFILETRHSSFPFTIPHSTTRD  
 TSLKGFYIPKGRCVFNQWQINHDQKLWVNPSEFLPERFLTPDGAIDKVLSEKVIIF  
 GMGKRKCIGETIARWEVFLFLAILLQRVEFSVPLGVKVDMPITYGLTMKHACCEH  
 FQMQLRS

### Obr. 12 Výsledky sekvenace DNA vektoru 1A1/pCW

- a) sekvenace DNA získaná sekvenací vektoru; podbarvené jsou sekvenace promotorů, tučně je označena sekvenace genu, podtržením jsou označena štěpící místa pro restriční endonukleasy NdeI (CATATG) a EcoRI (GAATTC).
- b) překlad získané sekvenace DNA genu *CYP1A1* do sekvenace aminokyselin; vyznačené jsou změny oproti konsenzuální sekvenci.

Sekvence aminokyselin se až na dvě změny shoduje s konsenzuálním lidským cytochromem P450 1A1. Jedná se o záměnu aminokyseliny Leu2 za Ala, která u tohoto proteinu zvyšuje výtěžky při expresi v *E. coli* [88]. Druhou mutací je konzervativní záměna Ile171 za Leu.

Na 5'-konci sekvenace DNA je provedeno větší množství mutací, které byly uměle zavedeny pomocí PCR. Jedná se „tiché“ mutace omezující tvorbu sekundárních struktur mRNA v této oblasti. Vzhledem k tomu, že zjištěné mutace v genu jsou buď konzervativní,

nebo se nacházejí v N-terminální oblasti, nebyl gen již dále modifikován. Bylo však rozhodnuto o jeho vložení do jiných plasmidů již zavedených v naší laboratoři.

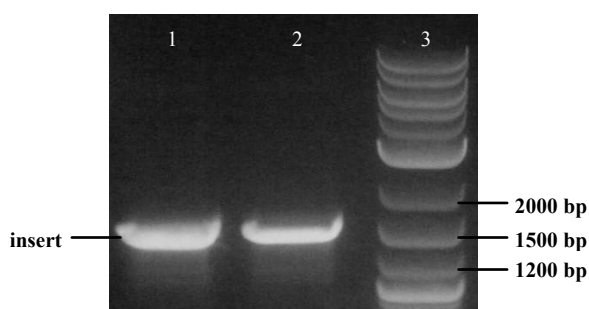
Sekvenace ale prokázala, že zastoupení štěpících míst v okolí genu, především dvojité zastoupení míst pro endonukleasu NdeI, znemožňuje přenos genu do jiného plasmidu pomocí přímého restričního štěpení, proto byla provedena polymerasová řetězová reakce. Z hlediska další práce byl důležitý i fakt, že se přímo v kódující sekvenci nachází štěpící místo pro restriční endonukleasu EcoRI, kterou v naší laboratoři používáme při přípravě jiných konstruktů.

#### 4.1.2 Amplifikace insertu obsahujícího lidský gen *CYP11A1*

Před vložení upraveného genu *CYP11A1* do klonovacího vektoru (pUC19) používaného v laboratoři, bylo potřeba zavést před a za gen vhodná restriční místa. Gen *CYP11A1* byl proto amplifikován s použitím navržených primerů uvedených v kapitole 3.3.9 a výsledný produkt byl přečištěn agarosovou elektroforézou a následně izolován. Na 5'-konec byla přidána štěpící místa pro restriční endonukleasy EcoRI (GAATTC) a NdeI (CATATG), přičemž cytosin na konci štěpícího místa pro EcoRI je cytosinem na počátku sekvence pro NdeI. Zároveň byl „forward“ navržen tak, aby se změnil čtvrtý kodon – CCA (minoritní kodon pro prolin u *E. coli* K-12, parentálního kmene pro DH5α) na CCG, který je hostitelským organismem naopak hojně využíván [121].

„Reverse“ primer byl navržen téměř komplementárně k získané sekvenci ze sekvenace vektoru. Z důvodu zachování teploty tání okolo 60 °C byl změněn terminační kodon z TAG na TAA. Na 3'-konec primeru byla přidána sekvence GAGCTC, která je komplementární ke štěpícímu místu pro endonukleasu XhoI (CTCGAG). Za ní byla dále přidána sekvence TTCGAA komplementární ke štěpícímu místu pro endonukleasu HindIII (AAGCTT). Nakonec byl přidán přesah tří bází ATG.

Výsledek polymerasové řetězové reakce ukazuje obrázek 13. Takto byl připraven insert se štěpícími místy, který mohl být dále vložen do klonovacího plasmidu pUC19.



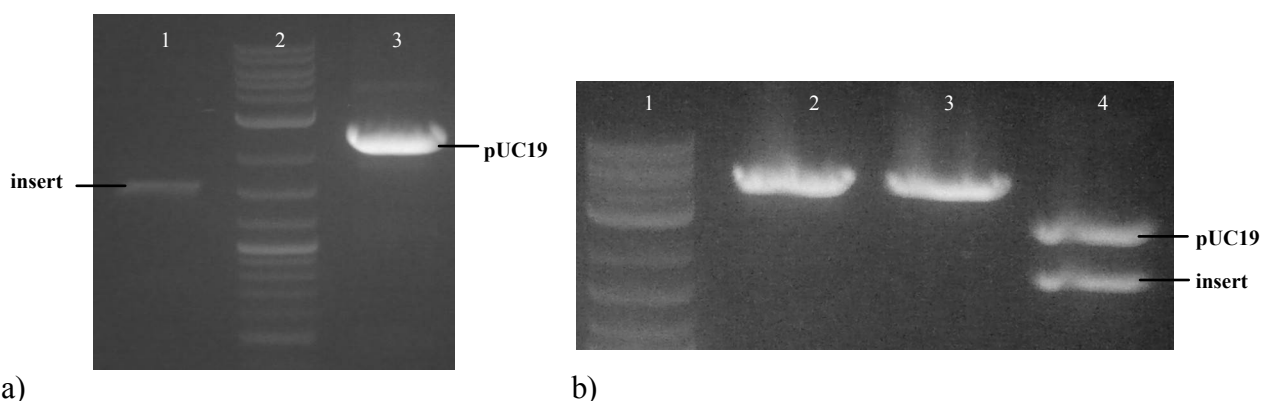
**Obr. 13 Amplifikace insertu s genem CYP1A1**

**1:** produkt PCR, gen CYP1A1 **2:** produkt PCR, gen CYP1A1 **3:** 2-log DNA ladder

#### 4.1.3 Vložení insertu CYP1A1 do plasmidu pUC19

Byla provedena dvojí restrikce pomocí endonukleas NdeI a HindIII jak s insertem genu *CYP1A1* připraveným v předchozím kroku, tak s plasmidem pUC19 (obrázek 14a). Štěpící místo pro EcoRI nebylo využito, neboť gen *CYP1A1* má stejné štěpící místo i ve své sekvenci a docházelo by k odštěpení části samotného genu.

Po izolaci obou fragmentů z agarosového gelu byla provedena ligace insertu do plasmidu pUC19, kterým byly následně transformovány buňky DH5 $\alpha$ . Z nich byl izolován minipreparací konstrukt dále nazývaný 1A1/pUC, který byl ověřen nejprve štěpením pomocí endonukleas NdeI a XhoI (obrázek 14b) a poté sekvenací DNA.



**Obr. 14 Příprava vektoru 1A1/pUC**

**a) 1:** insert *CYP1A1* štěpený endonukleasami NdeI a HindIII; **2:** 2-log DNA Ladder; **3:** pUC19 štěpený endonukleasami NdeI a HindIII

**b) 1:** 2-log DNA Ladder; **2:** 1A1/pUC19 štěpený Xho; **3:** 1A1/pUC štěpený NdeI; **4:** 1A1/pUC štěpený NdeI a XhoI

#### 4.1.4 Ověření vektoru 1A1/pUC sekvenací DNA a jeho midipreparace

Pro sekvenaci plasmidu pUC19 lze použít primery M13F a M13R. Avšak použitím štěpících míst NdeI a HindIII došlo k vyštěpení sekvence komplementární s běžně

používaným „forward“ primerem M13F, a proto byl navržen nový primer uvedený v kapitole 3.3.15 pod názvem pUC19NdeI, který nasedá před štěpící místo NdeI. Sekvence potvrdila správnost sekvence celého genu *CYP1A1* (obrázek 15).

```

AGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGGCTTTTCCGATTTCATGTCAGCAACGGAG
TTTCTTCTGGCCTCTGTTCATCTTCTGTCTGGTATTCTGGGTAATCAGGGCCTCAAGACCTC
AGGTCCCCAAAGGCCTGAAGAATCCACCAGGGCCATGGGGCTGGCCTCTGATTGGGCACAT
GCTGACCTTGGGAAAGAACCCGCACCTGGCACTGTCAAGGATGAGCCAGCAGTATGGGGAC
GTGCTGCAGATCCGAATTGGCTCCACACCCGTGGTGGTGTGCTGAGCGGCCTGGACACCATCC
GGCAGGCCCTGGTGCAGGCGAGGCGATGATTTCAAGGGCCGGCCCGACCTCTACACCTTCAC
CCTCATCAGTAATGGTCAGAGCATGTCTTTCAGCCCAGACTCTGGACCAGTGTGGGCTGCC
CGCCGGCGCCTGGCCCAGAATGGCCTGAAAAGTTTCTCCATTGCCTCTGACCCAGCCTCCT
CAACCTCCTGCTACCTGGAAGAGCATGTGAGCAAGGAGGCTGAGGTCTGTTAAGCACGTT
GCAGGAGCTGATGGCAGGGCCTGGGCACTTTAACCCCTACAGGTATGTGGTGGTATCAGTG
ACCAATGTCATCTGTGCCATTTGCTTTGGCCGGCGCTATGACCACAACCACCAAGAAGTGC
TTAGCCTAGTCAACCTGAATAATAATTTGCGGGAGGTGGTTGGCTCTGGAAACCCAGCTGA
CTTCATCCCTATTCTTCGCTACCTACCCAACCTTCCCTGAATGCCTTCAAGGACCTGAAT
GAGAAGTTCTACAGCTTCATGCAGAAGATGGTCAAGGAGCACTACAAAACCTTTGAGAAGG
GCCACATCCGGGACATCACAGACAGCCTGATTGAGCACTGTCAGGAGAAGCAGCTGGATGA
GAACGCCAATGTCCAGCTGTCAGATGAGAAGATCATTAACATCGTCTTGGACCTCTTTGGA
GCTGGGTTTGACACAGTCACAACTGCTATCTCCTGGAGCCTCATGTATTTGGTGTATGAACC
CCAGGGTACAGAGAAAGATCCAAGAGGAGCTAGACACAGTGATTGGCAGGTCACGGCGGCC
CCGGCTCTCTGACAGATCCCATCTGCCCTATATGGAGGCCTTCATCCTGGAGACCTTCCGA
CACTCTTCCCTTCGTCCCTTTCACCATCCCCACAGCACACAAGAGACACAAGTTTGAAAG
GCTTTTACATCCCCAAGGGGCGTTGTGTCTTTGTAAACCAGTGGCAGATCAACCATGACCA
GAAGCTATGGGTCAACCCATCTGAGTTCCTACCTGAACGGTTTCTCACCCCTGATGGTGTCT
ATCGACAAGGTGTTAAGTGAGAAGGTGATTATCTTTGGCATGGGCAAGCGGAAGTGTATCG
GTGAGACCATTGCCCGCTGGGAGGTCTTTCTCTTCCCTGGCTATCCTGCTGCAACGGGTGGA
ATTCAGCGTGCCACTGGGCGTGAAGGTGGACATGACCCCATCTATGGGCTAACCATGAAG
CATGCCTGCTGTGAGCACTTCCAAATGCAGCTGCGCTCTTAACTCGAGAAGCTT

```

**Obr. 15** Nukleotidová sekvence upraveného genu *CYP1A1* vložená v plasmidu pUC19. Šedě podbarvená sekvence byla ověřena sekvenací; tučně je vyznačena sekvence genu *CYP1A1*; podtržením jsou označena místa pro štěpící endonukleasy NdeI (CATATG), XhoI (CTCGAG) a HindIII (AAGCTT).

Sekvenací nebyl ověřen 3' -konec, respektive sekvence štěpících míst pro XhoI a HindIII. Vektor byl ale úspěšně štěpen endonukleasou XhoI a navíc se jednalo o sekvenci „reverse“ primeru, jehož část se sekvenací podařilo zachytit. Je tedy velice pravděpodobné, že nekódující část konstruktu obsahující restriční místa je v pořádku.

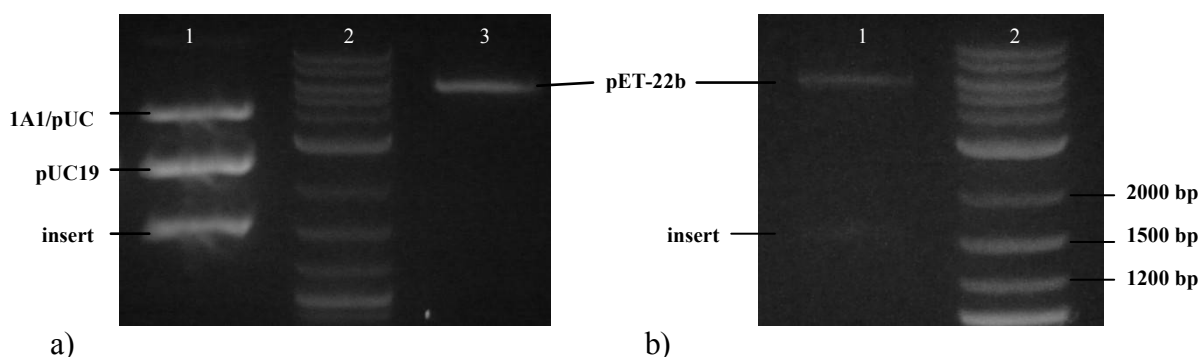
Ze zamrazené kultury buněk DH5 $\alpha$  nesoucích ověřený konstrukt byla připravena kultura o vyšším objemu pro midipreparaci DNA. Koncentrace a čistota připraveného vektoru je uvedena v tabulce 10.

**Tab. 10 Koncentrace a čistota vektoru 1A1/pUC získaného midipreparací**

c [μg/ml]	$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}}$	$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{230} - A_{320}}$
195,5	1,88	1,91

#### 4.1.5 Přenesení insertu CYP1A1 do plasmidu pET-22b

Gen *CYP1A1* byl vyštěpen z vektoru 1A1/pUC endonukleasami NdeI a XhoI, kterými byl štěpen i plasmid pET-22b. Oba fragmenty DNA byly přečištěny agarosovou elektroforézou a následně izolovány z gelu. Poté byla provedena ligace štěpeného genu *CYP1A1* do plasmidu pET-22b a následovala amplifikace nového vektoru v buňkách kmene DH5 $\alpha$ . Vektor nazvaný 1A1/pET byl izolován minipreparací a ověřen dvojím štěpením pomocí endonukleas NdeI a XhoI. Obrázek 16 shrnuje celou přípravu.



**Obr. 16 Příprava vektoru 1A1/pET**

a) **1:** vektor 1A1/pUC (3962 bp) štěpený endonukleasami NdeI a XhoI; fragment 2422 bp odpovídá plasmidu pUC19, fragment 1540 bp odpovídá genu *CYP1A1*; **2:** marker 2-log DNA ladder; **3:** pET-22b štěpený endonukleasami XhoI a NdeI

b) **1:** vektor 1A1/pET štěpený endonukleasami XhoI a NdeI; fragment 5371 bp odpovídá štěpenému plasmidu pET-22b, fragment 1540 bp odpovídá genu *CYP1A1*, **2:** marker 2-log DNA ladder

Jak je vidět z obrázku 16a, jisté množství vektoru 1A1/pUC nepodlehlo dvojitému štěpení, ale bylo štěpeno pouze jedním ze štěpicích enzymů, což vedlo k jeho linearizaci. Přesto bylo množství vyštěpeného genu *CYP1A1* dostatečné pro izolaci a pro úspěšnou

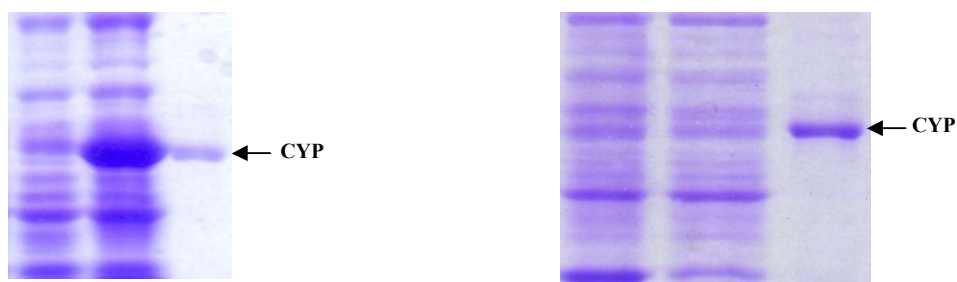


ligaci. Vektor 1A1/pET připravený minipreparací byl transformován do expresních kmenů bakterie *E. coli* určených k expresním pokusům.

#### 4.1.6 Exprese cytochromu P450 1A1 pomocí vektoru 1A1/pET

Vektor 1A1/pET byl transformován do buněk *E. coli* kmenů BL21-Gold (DE3) a BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, které jsou určeny k expresi genů pomocí T7 RNA polymerasy. Provedené pokusy zahrnovaly změny teploty i koncentrace IPTG, nutného pro indukci exprese. Současně s přidáním IPTG byla vždy přidána i ALA jako prekurzor hemu do koncentrace 0,5 mM.

Prvním pokusem byla exprese genu v obou kmenech při teplotě 30 °C v LB médiu. Po nárůstu buněk do  $OD_{600} = 1$  byl přidán IPTG na výslednou 1 mM koncentraci. Exprese CYP1A1 u kmene BL21-Gold (DE3) byla velmi silná (obr. 17a), zatímco u kmene BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL nebyl pomocí SDS-PAGE detekován znatelný nárůst proteinu po indukci (obr. 17b). Stejně tak i produkce u kmene BL21-CodonPlus(DE3)-RIL byla bez znatelného nárůstu proteinu (data nejsou ukázána).



**Obr. 17 Exprese genu *CYP1A1* v buňkách *E. coli***

Podmínky exprese – teplota 30 °C, 1 mM IPTG, exprese probíhala 20 hodin.

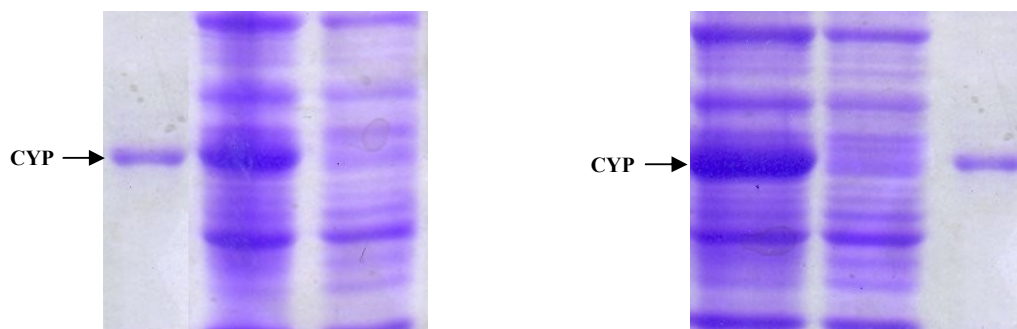
a) exprese v buňkách BL-21 Gold (DE3)  
zleva - buňky před indukcí; buňky po  
indukci; králičí CYP1A2

b) exprese v buňkách BL21-  
CodonPlus(DE3)-RIPL  
zleva – buňky před indukcí; buňky po  
indukci; králičí CYP1A2

Následující experimenty byly proto prováděny s kmenem BL21-Gold (DE3) a to především ve snaze zpomalit expresi za účelem omezení tvorby inkluzních tělísek.

Exprese byla prováděna stejně, avšak při teplotě 24°C a 18 °C (obrázky 18a a 18b), a v druhém případě byla navíc snížena i koncentrace IPTG na 50  $\mu$ M. Vysoká míra exprese

však zůstala zachována. Expres při ještě nižší teplotě již prováděna nebyla, neboť při nižší teplotě je poškozen růst bakterií *E. coli* [122].

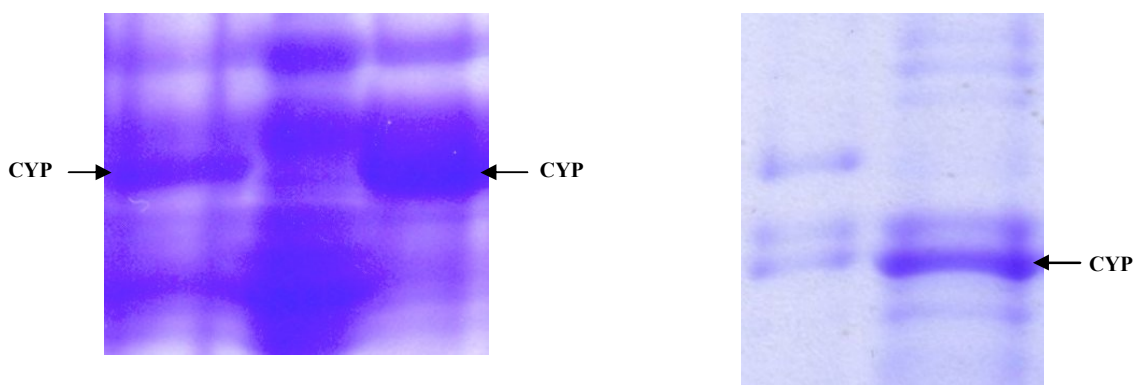


**Obr. 18 Expres genu *CYP1A1* v buňkách *E. coli* při nižších teplotách**

a) Podmínky exprese – teplota 24 °C; 1 mM IPTG, exprese probíhala 18 hodin  
zleva - králíčí CYP1A2; buňky po indukci; buňky před indukci

b) Podmínky exprese – teplota 18 °C; 0,05 mM IPTG, exprese probíhala 18 hodin  
zleva – buňky po indukci; buňky před indukci; králíčí CYP1A2

Pro ověření množství nativního CYP1A1 vázaného v bakteriální membráně bylo potřeba provést expresi ve větším měřítku. Podmínky růstu při 18 °C a indukce 50  $\mu$ M IPTG byly použity při expresi v 500 ml LB média. Buňky byly po nárůstu sonikovány a byla z nich připravena membránová frakce. Jak se ale ukázalo při analýze pomocí elektroforézy, velké množství cytochromu P450 bylo přítomno v inkluzních tělískách (obr. 19a). Protein, který byl vázán v získaných membránách, bylo obtížné solubilizovat. (obr. 19b).



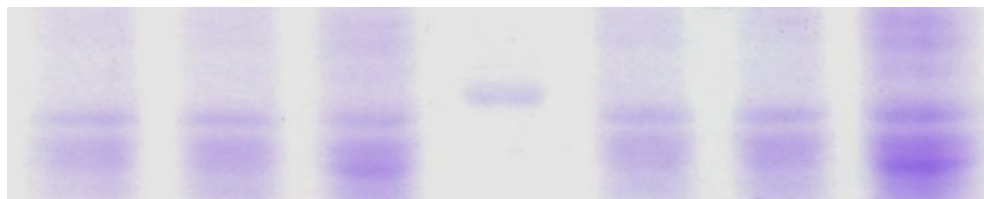
**Obr. 19 Inkluzní tělíska a solubilizace membrán s proteinem CYP1A1**

a) Frakční centrifugace  
zleva – inkluzní tělíska (12500x ředěno proti původnímu objemu média); cytosol (4000x ředěno); membrány (4000x ředěno)

b) Solubilizace  
zleva – solubilizát (7000x ředěno); membrány po solubilizaci (25000x ředěno)

Ve snaze zvýšit produkci solubilizovatelné formy CYP1A1 byla také testována exprese v buňkách úspěšně používaných k produkci králičího CYP2B4 [123].

Konstrukt 1A1/pET byl transformován do buněk OverExpress C41(DE3) a OverExpress C43(DE3). Buňky byly indukovány při optické denzitě  $OD_{600} = 1,6$  pomocí 0,5 mM IPTG, při 18 °C po dobu 48 hodin. Jak je patrné z obrázku 20, exprese nebyla prakticky znatelná, proto bylo přikročeno k použití původního vektoru odvozeného od plasmidu pCW.



**Obr. 20** Exprese genu *CYP1A1* v buňkách C41 a C43

Zleva – C41 před indukcí; C41 jeden den po indukcí; C41 dva dny po indukcí; králičí CYP1A2; C43 před indukcí; C43 jeden den po indukcí; C43 dva dny po indukcí

#### 4.1.7 Exprese cytochromu P450 v buňkách *E. coli* pomocí vektoru

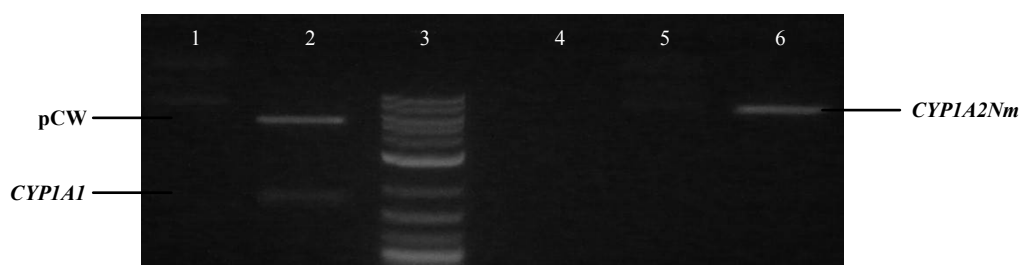
##### 1A1/pCW

Původní zaslaný vektor 1A1/pCW byl izolován midipreparací s výtěžkem a čistotou uvedenou v tabulce 11.

**Tab. 11** Koncentrace a čistota vektoru 1A1/pCW získaného midipreparací

c [μg/ml]	$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}}$	$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{230} - A_{320}}$
52	1,97	1,36

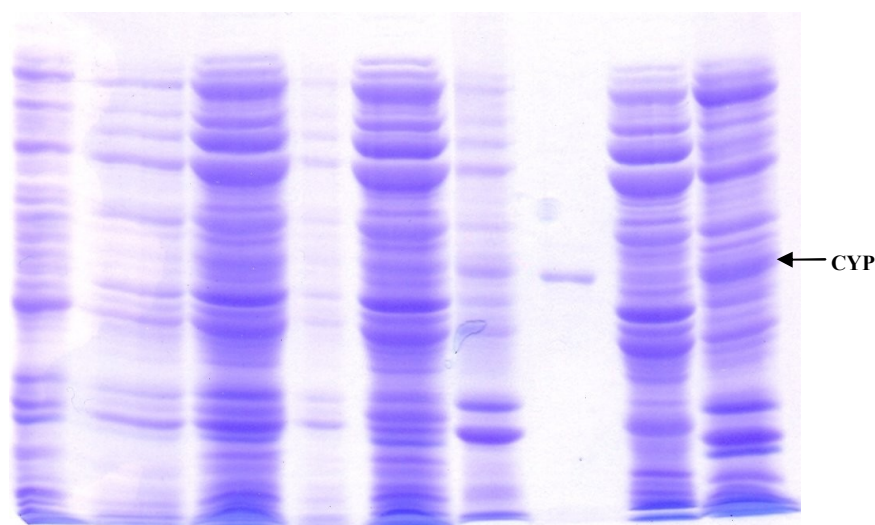
Vektor 1A1/pCW byl dále ověřen a odlišen od podobného vektoru 1A2Nm/pCW, jehož příprava midipreparací probíhala ve stejné době, pomocí štěpení endonukleasou NdeI. Jelikož vektor 1A1/pCW obsahuje štěpící místa pro NdeI na obou koncích genu CYP1A1 a vektor 1A2Nm/pCW disponuje pouze jediným místem před genem CYP1A2Nm, lze takto oba vektory snadno odlišit. Jak je patrné z obrázku 21, vektor 1A1/pCW byl štěpen na dva fragmenty, kdežto vektor 1A2/pCW byl štěpen pouze na jednom místě a tím byl linearizován.



**Obr. 21** Ověření vektorů 1A1/pCW a 1A2Nm/pCW pomocí štěpení endonukleasou *NdeI*

**1:** neštěpený 1A1/pCW; **2:** štěpený vektor 1A1/pCW s vyštěpeným genem CYP1A1; **3:** 2-Log DNA ladder; **4:** volná dráha; **5:** neštěpený 1A2Nm/pCW; **6:** štěpený a linearizovaný vektor 1A2Nm/pCW

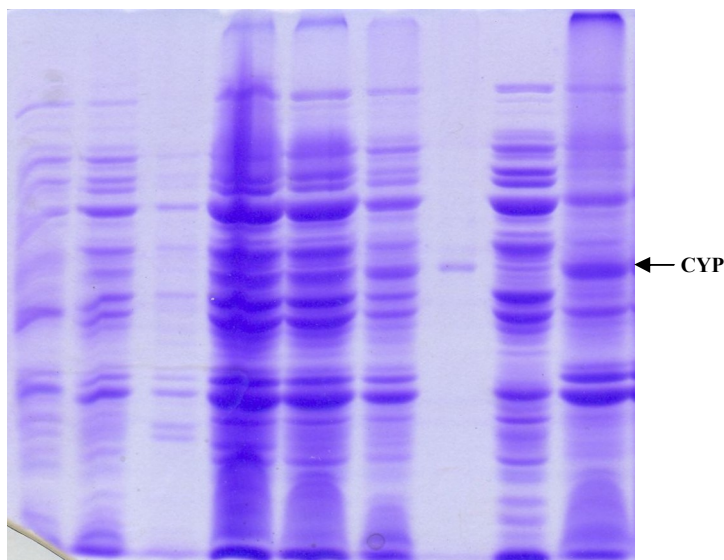
Vektor 1A1/pCW byl transformován do buněk DH5 $\alpha$ , které jsou pro tento konstrukt běžně používaným expresním kmenem. Pokusná exprese byla provedena v 250 ml modifikovaného TB médiu po nárůstu buněk do optické denzity OD<sub>600</sub> = 0,6. Buňky byly indukovány 1 mM IPTG a produkce trvala 32 hodin. Výsledný přehled produkce ukazuje obrázek 22, přičemž v poslední dráze (membrány) je zřejmý znatelný nárůst proteinu odpovídající cytochromu P450 1A1.



**Obr. 22** Exprese genu CYP1A1 v buňkách kmene DH5 $\alpha$

Zleva – buňky před indukcí; buňky po indukcí; sonikované buňky (5000x ředěno); nerozbité buňky (5000x ředěno); supernatant 18000g (5000x ředěno); inkluzní tělíska (5000x ředěno); králíčí CYP1A2; cytosol (5000x ředěno); membrány (1200x ředěno)

Pro zachování vyššího výtěžku membránové frakce obsahující protein byla v rámci přípravy vyzkoušena i technika izolace sferoplastů. Elektroforetický gel (obrázek 23) ukazuje, že podíl cytochromu P450 1A1 v membránách ještě více narostl.



**Obr. 23** Exprese genu CYP1A1 v buňkách kmene DH5α s přípravou sferoplastů

Zleva – buňky před indukcí; buňky po indukcí; buněčné stěny (40000x ředěno); sferoplasty (16000x ředěno); sonikované sferoplasty (40000x ředěno); inkluzní tělíska a nerozbité buňky (20000x ředěno); králíčí CYP1A2; cytosol (20000x ředěno); membrány (5000x ředěno)

Tento přehled exprese pochází z produkce v 1 litru modifikovaného TB média provedené pro izolaci cytochromu P450 1A1. Protein byl poté solubilizován a solubilizát byl separován gradientovou elucí na sloupci DEAE Sepharosy CL-6B.

Hemoprotein byl eluován při iontové síle cca 500 mM KCl (konec gradientu). Po provedené elektroforéze se ale ukázalo, že se jedná o protein s mnohem vyšší molekulovou hmotností, než by odpovídal cytochromu P450 1A1. Byl učiněn pokus o vymytí požadovaného proteinu s použitím 1 M KCl, ale bez úspěchu. Izolace byla poté ukončena a dále bylo pokračováno v izolaci dalšího proteinu – cytochromu P450 1A2.

## 4.2 Příprava CYP1A2

### 4.2.1 Charakterizace vektoru

Stejně jako v případě vektoru 1A1/pCW, i tento vektor byl získán darem od profesora Guengeriche. Konstrukt byl namnožen v buňkách DH5α a izolován minipreparací, čímž bylo získáno přibližně 27 ug o čistotě vyžadované sekvenační laboratoří ( $A_{260}/A_{280} = 1,89$ ). Vektor byl sekvenován navrženým „forward“ primerem

uvedeným v kapitole 3.3.15. Pro tuto sekvenaci nebyl použit „reverse“ primer, neboť nebyla známa sekvence plasmidu pCW nacházející se za 3'-koncem genu.

Sekvenací (obrázek 24) bylo zachyceno 591 bází genu, což odpovídá 197 aminokyselinám proteinu.

a)

```
CC CAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACA
ATTTACACACAGGAAACAGGATCGATCCATCGATGAGCTTACTCCCCATCCCCCTGTTGACA
ATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACACAGGAAA
CAGGATCAGCTTACTCCCCATCCCCCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTG
GAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACACAGGAAACAGGATCCATCGATGCTTAGGAGGTCA
TATGGCTCTGTTATTAGCAGTTTTTCTGTTCTGCCTGGTATTCTGGGTGCTCAAGGGTTTG
AGGCCTCGGGTCCCCAAAGGCCTGAAAAGTCCACCAGAGCCATGGGGCTGGCCCTTGCTCG
GGCATGTGCTGACCCTGGGGAAGAACCCGCACCTGGCACTGTCAAGGATGAGCCAGCGCTA
CGGGGACGTCCTGCAGATCCGCATTGGCTCCACGCCCGTGCTGGTGCTGAGCCGCTGGAC
ACCATCCGGCAGGCCCTGGTGCGGCAGGGCGACGATTTCAAGGGCCGGCCTGACCTCTACA
CCTCCACCCTCATCACTGATGGCCAGAGCTTGACCTTCAGCACAGACTCTGGACCGGTGTG
GGCTGCCCCGCCGGCGCCTGGCCCAGAATGCCCTCAACACCTTCTCCATCGCCTCTGACCCA
GCTTCCTCATCCTCCTGCTACCTGGAGGAGCATGTGAGCAAGGAGGCTAAGGCCCTGATCA
GCAGGTTGCAGGAGCTGATGGCAGGGCCTGGGCACCTTCGACCCTTACAATCAGGTGGTGGT
GTCAGTGGCCAACGTCATTGGTGCCATGTGCTTCGGACAGCAC
```

b)

```
MALLAVFLFCLVFWVLKGLRPRVPKGLKSPPEPWGWPLLGHVLTGLGNPHLALS
RMSQRYGDVLQIRIGSTPVLVLSRLDTIRQALVRQGDDFKGRPDLYTSTLITDGQSL
TFSTDSGPVWAARRRLAQNALNTFSIASDPASSSSCYLEEHVSKEAKALISRLQEL
MAGPGHFDPYNQVVVSVANVIGAMCFGQH
```

#### Obr. 24 Výsledky sekvenace DNA vektoru 1A2/pCW

a) sekvence DNA získaná sekvenací vektoru; podbarvené jsou sekvence promotorů, tučně je označena sekvence genu, podtržením je označeno štěpící místo pro restrikční endonukleasu NdeI (CATATG).

b) překlad získané sekvence DNA do sekvence aminokyselin.

Srovnáním získané sekvence DNA s konsenzuální sekvencí *CYP1A2* pocházející z „CCDS Database“ [124] byly nalezeny rozsáhlé úpravy 5'-konce cDNA, které se promítají do aminokyselinového složení N-terminálního konce proteinu. Sekvence DNA byla upravena odstraněním původních 20 kodonů a jejich nahrazením novými 12 kodony,

kteří kódují prvních 12 aminokyselin z modifikovaného hovězího cytochromu P450 17A1 (obrázek 25). Jak uvádí kapitola 1.5 nahrazení N-konce za tzv. Barnesovu sekvenci je často užívanou mutací pro vyšší expresi cytochromů P450 v bakteriálním expresním systému.

Byla zachycena i sekvence plasmidu nacházející se před genem *CYP1A2* a složení promotorů (1x *lacUV5*, 2x *tac*) odpovídá plasmidu pCW. Tento vektor byl kvůli úpravě aminokyselin N-konce kódovaného proteinu nazván 1A2Nm/pCW

#### **CYP1A2**

cDNA **ATGGCATTGTCCCAGTCTGTTCCCTTCTCGGCCACAGAGCTTCTCCTGGCCTCTGCCATC**

Překlad MALSQSVPFSAATELLLASAIFCL

#### **CYP1A2Nm**

cDNA **ATGGCTCTGTTATTAGCAGTTTTTCTG**

Překlad MALLLAVFLFCL

#### **Obr. 25 Úprava sekvence aminokyselin v genu *CYP1A2Nm* v plasmidu pCW**

Tučně jsou označena sekvence 5'-konce cDNA nativního genu *CYP1A2* a *CYP1A2Nm*; nahrazená proteinová sekvence je označena podtržením. Bližší informace o důvodu nahrazení aminokyselin jsou uvedeny v textu.

Protože původním cílem práce bylo získat cytochrom P450 1A2 s N-terminální doménou odpovídající nativnímu proteinu, bylo rozhodnuto o opravě pozměněného genu *CYP1A2Nm* polymerasovou řetězovou reakcí. Úprava zahrnovala nejen změnu N-konce proteinu, ale i přidání vhodných štěpících míst pro vložení získaného insertu do plasmidů zavedených v naší laboratoři.

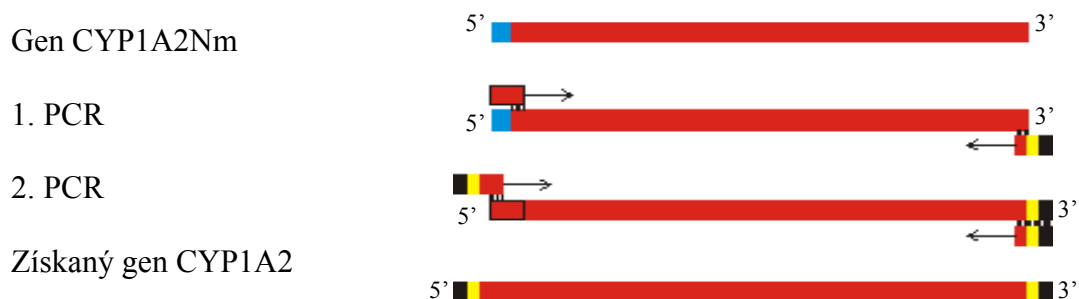
### **4.2.2 Amplifikace insertu obsahující lidský gen *CYP1A2***

Původní gen *CYP1A2Nm* byl upraven dvěma polymerasovými řetězovými reakcemi pomocí navržených primerů zmíněných v kapitole 3.3.9. Celkové schéma amplifikace ukazuje obrázek 26.

Hlavní úpravou provedenou na 5'-konci sekvence DNA bylo nahrazení 9 kodonů kravského *CYP17A1* za 20 kodonů kódujících N-terminální doménu shodnou s lidským cytochromem P450 1A2. Tato nová sekvence však nebyla navržena jako identická s cDNA nativního lidského genu *CYP1A2*, nýbrž byla optimalizována pomocí programu Optimizer [125] tak, aby zastoupení kodonů v této sekvenci odpovídalo často používaným kodonům



bakterií *E. coli* příbuzných s kmenem K-12. Před samotný gen byla dále připojena restriční místa pro endonukleasy EcoRI (GAATTC) a NdeI (CATATG) a na úplný začátek 5'-konce primeru byl dodán třibázový přesah GAC.



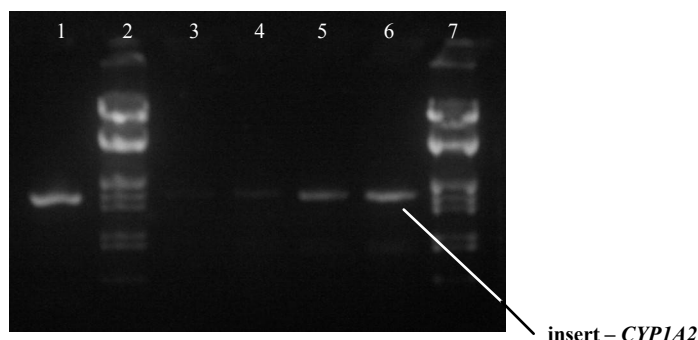
**Obr. 26 Schéma úpravy genu *CYP1A2Nm* pomocí dvou následných PCR**

Oranžovou barvou je značena nezměněná sekvenční DNA genu *CYP1A2Nm*; modrou sekvenční hovězího *CYP17A1*, žlutou štěpící místa pro endonukleasy NdeI a XhoI; černou štěpící místa pro endonukleasy EcoRI a HindIII.

Ačkoliv nebyla známa přesná sekvenční 3'-konce cDNA, byl navržen „reverse“ primer dle sekvenční *CYP1A2* uvedené v [126], kterou profesor Guengerich vložil do plasmidu pCW [88]. Na konec genu byly dále připojeny komplementární sekvenční k restričním místům endonukleas XhoI (CTCGAG) a HindIII (AAGTCC) a třibázový přesah TAC.

Produkt první polymerasové řetězové reakce byl přečištěn na agarosovém gelu, izolován a použit jako templát pro druhou reakci. Na této druhé reakci byla kvůli délce „reverse“ primeru pozměněna teplota polymerace z konvenčních 72 °C na 75° C, respektive 78 °C. Touto amplifikací se podařilo získat insert, který bylo možné vložit do klonovacího plasmidu pUC19. Konečný produkt amplifikace (obrázek 27, dráhy 5 a 6) byl přečištěn na agarosové elektroforéze a následně byl z gelu izolován.





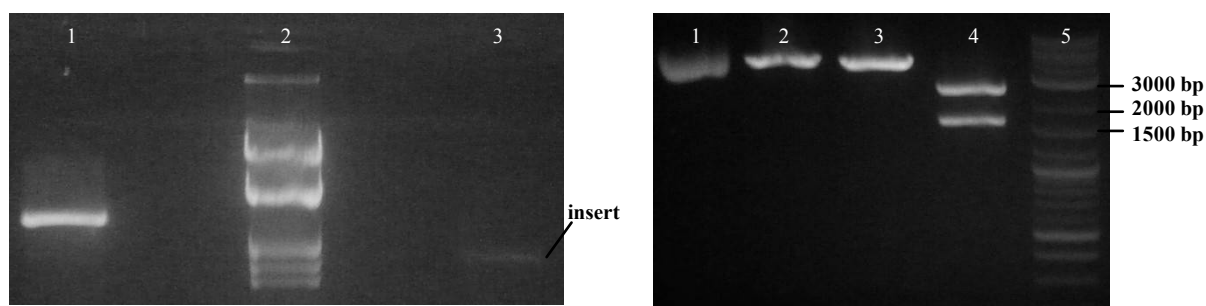
**Obr. 27 Amplifikace insertu *CYP1A2***

**1:** produkt první PCW; **2:**  $\lambda$  DNA marker; **3:** produkt 2. PCR (75 °C), 5  $\mu$ l; **4:** produkt 2. PCR (75 °C), 10  $\mu$ l; **5:** produkt 2. PCR (78 °C), 5  $\mu$ l; **6:** produkt 2. PCR (78 °C), 10  $\mu$ l; **7:**  $\lambda$  DNA marker

#### 4.2.3 Vložení insertu genu *CYP1A2* do klonovacího plasmidu pUC19

Amplifikovaný a izolovaný insert s genem *CYP1A2*, jehož příprava byla popsána v předchozí kapitole, byl štěpen restričními endonukleasami EcoRI a HindIII. Stejnými restričními endonukleasami byl štěpen i plasmid pUC19 (obrázek 28a).

Po přečištění fragmentů na agarosovém gelu a jejich izolaci byla provedena ligace a transformace ligační směsi do buněk *E. coli* kmene DH5 $\alpha$ . Z narostlých kolonií byl izolován konstrukt dále nazývaný jako 1A2/pUC, který byl nejprve ověřen štěpením pomocí endonukleas NdeI a XhoI (obrázek 28b) a následně sekvenací DNA.



**Obr. 28 Příprava vektoru 1A2/pUC**

a) **1:** plasmid pUC19 štěpený EcoRI a HindIII; **2:**  $\lambda$  DNA marker; **3:** insert *CYP1A2* štěpený endonukleasami EcoRI a HindIII

b) **1:** 1A2/pUC; **2:** 1A2/pUC štěpený NdeI (4200 bp); **3:** 1A2/pUC štěpený XhoI; **4:** 1A2/pUC štěpený NdeI a Xho I; **5:** 2-log DNA ladder

#### 4.2.4 Ověření vektoru 1A2/pUC sekvenací DNA a jeho midipreparace

Vektor 1A2/pUC byl sekvenován s pomocí primerů M13F a M13R. Získaná sekvence zobrazená na obrázku 29 potvrdila téměř celou sekvenci genu *CYP1A2*.

a)

GAATTCATATGGCGCTGTCTCAGTCTGTTCCGTTCTCTGCGACCGAACTGCTGCTG  
 GCGTCTGCGATCTTCTGCCTGGTATTCTGGGTGCTCAAGGGTTTGAGGCCTCGGGTCCCCA  
 AAGGCCTGAAAAGTCCACCAGAGCCATGGGGCTGGCCCTTGCTCGGGCATGTGCTGACCCT  
 GGGGAAGAACCCGCACCTGGCACTGTCAAGGATGAGCCAGCGCTACGGGGACGTCTGTCAG  
 ATCCGCATTGGCTCCACGCCCGTGCTGGTGCTGAGCCGCCTGGACACCATCCGGCAGGCCC  
 TGGTGCGGCAGGGCGACGATTTCAAGGGCCGGCCTGACCTCTACACCTCCACCCTCATCAC  
 TGATGGCCAGAGCTTGACCTTCAGCACAGACTCTGGACCGGTGTGGGCTGCCCCGCCGGCGC  
 CTGGCCCAGAATGCCCTCAACACCTTCTCCATCGCCTCTGACCCAGCTTCCTCATCCTCCT  
 GCTACCTGGAGGAGCATGTGAGCAAGGAGGCTAAGGCCCTGATCAGCAGGTTGCAGGAGCT  
 GATGGCAGGGCCTGGGCACTTCGACCCTTACAATCAGGTGGTGGTGTCAGTGGCCAACGTC  
 ATTGGTGCCATGTGCTTCGGACAGCACTTCCTGAGAGTAGCGATGAGATGCTCAGCCTCG  
 TGAAGAACACTCATGAGTTCGTGGAGACTGCCTCCTCCGGGAACCCCTGGACTTCTTCCC  
 CATCCTTCGCTACCTGCCTAACCTGCCCTGCAGAGGTTCAAGGCCCTTCAACCAGAGGTTT  
 CTGTGGTTCCTGCAGAAAACAGTCCAGGAGCACTATCAGGACTTTGACAAGAACAGTGTCC  
 GGGACATCACGGGTGCCCTGTTCAAGCACAGCAAGAAGGGGCCCTAGAGCCAGCGGCAACCT  
 CATCCACAGGAGAAGATTGTCAACCTTGTCAATGACATCTTTGGAGCAGGATTTGACACA  
 GTCACCACAGCCATCTCCTGGAGCCTCATGTACCTTGTGACCAAGCCTGAGATACAGAGGA  
 AGATCCAGAAGGAGCTGGACACTGTGATTGGCAGGGAGCGGCGGCCCGGCTCTCTGACAG  
 ACCCCAGCTGCCCTACTTGGAGGCCTTCATCCTGGAGACCTTCCGACACTCCTCCTTCTTG  
 CCCTTCACCATCCCCCACAGCACACAAGGGACACAACGCTGAATGGCTTCTACATCCCCA  
 AGAAATGCTGTGTCTTCGTAAACAGTGGCAGGTCAACCATGACCCAGAGCTGTGGGAGGA  
 CCCCTCTGAGTTCGGCCCTGAGCGGTTCTCACCGCCGATGGCACTGCCATTAACAAGCCC  
 TTGAGTGAGAAGATGATGCTGTTTGGCATGGGCAAGCGCCGGTGTATCGGGGAAGTCCTGG  
 CCAAGTGGGAGATCTTCCTCTTCCTGGCCATCCTGCTACAGCAACTGGAGTTCAGCGTGCC  
 GCCGGGCGTGAAAGTCGACCTGACCCCATCTACGGGCTGACCATGAAGCACGCCCGCTGT  
 GAACATGTCCAGGCGCGGCTGCGCTTCTCCATCAATTGACTCGAGAAGCTT

b)

MALSQSVFPFSATELLLASAIFCLVFWVLKGLRPRVPGKLSPPPEPWGWPLLGHVLTGLKNP  
 HLALSRMSQRYGDLVQIRIGSTPVLVLSRLDTRQALVRQGDDFKGRPDLYTSTLITDGQS  
 LTFSTDSGPVWAARRRLAQNALNTFSIASDPASSSSCYLEEHVSKEAKALISRLQELMAGP  
 GHFDPYNQVVSVANVIGAMCFGQHFPESSDEMLSLVKNTHFVETASSGNPLDFFPIRLY  
 LPNPALQRFKAFNQFLWFLQKTVQEHYQDFDKNSVRDITGALFKHSHKGPASGNLIPQE  
 KIVNLVNDIFGAGFDTVTTAISWSLMYLVTKPEIQRKIQKELDTVIGRERRPRLSDRPQLP  
 YLEAFILETFRHSSFLPFTIPHSTTRDITLNGFYIPKKCCVFVNQWQVNHDPEDPSEF  
 RPERFLTADGTAINKPLSEKMMLFGMGKRRRCIGEVLAKEIFLFLAILLQQLEFSVPPGVK  
 VDLTPIIYGLTMKHARCEHVQARLRFSIN

### Obr. 29 Výsledky sekvenace vektoru 1A2/pUC

a) Očekávaná sekvence genu *CYP1A2* s okolím; šedým podbarvením je označen úsek, který se podařilo zachytit sekvenací; tučně je označen gen *CYP1A2*; podtržením jsou označeny sekvence primerů užívané k amplifikaci; přerušovaným podtržením jsou označena dodaná štěpící místa pro endonukleasy.

b) Aminokyselinová sekvence cytochromu P450 1A2 přeložená z tučně označené sekvence obrázku 27a; šedým podbarvením je označen úsek potvrzený sekvenací.

Jelikož úseky DNA, které nebyly zachyceny sekvenací, byly při amplifikaci přidány pomocí primerů a vektor byl navíc úspěšně štěpen endonukleasami NdeI a XhoI (obrázek 28), jsou nezachycené úseky pravděpodobně v pořádku.

Překvapivým faktem bylo nalezení kodonu CGC na 3'-konci sekvence, který kóduje aminokyselinu Arg512 místo původního CCG, který byl součástí navrženého „reverse“ primeru. Tento primer byl ale navržen jako komplementární k sekvenci z práce [126], ve které se právě na této pozici nachází mutace CCG měnící Arg512 na Pro512. Nemohlo se tedy jednat o náhodnou mutaci. Možným vysvětlením je chyba v sekvenaci genu *CYP1A2* v [126] a opravná aktivita použité Pfu DNA polymerasy, která svou 3'-exonukleasovou aktivitou odštěpila 5 bází na 3'-konci „reverse“ primeru a opravila chybnou sekvenci dle sekvence genu (obrázek 30). Díky této změně byla odstraněna další mutace měnící aminokyselinové složení a získaná DNA kóduje cytochrom P450 1A2, který plně odpovídá formě „wild-type“ [127].

<i>CYP1A2</i> ze sekvenace	5' – CGCGCTGCGCTTCTCCATCAATTGA – 3'
sekvence pro primer	5' – TGCCGTTCTCCATCAATTGACTCGAGAAGCTTTAC – 3'
„reverse“ primer	5' – ACGGCAAGAGGTAGTTAACTGAGCTCTTCFAAATG – 3'
„reverse“ primer	3' – GTAAAGCTTCTCGAGTCAATTGATGGAGAACGGCA – 5'

### Obr. 30 Záměna kodonů Pro512 za Arg512

Tučně je zobrazena překrývající se část cDNA cytochromu P450 1A2 a „reverse“ primeru; podtržením je vyznačena dvojice bází, u nichž došlo k záměně.

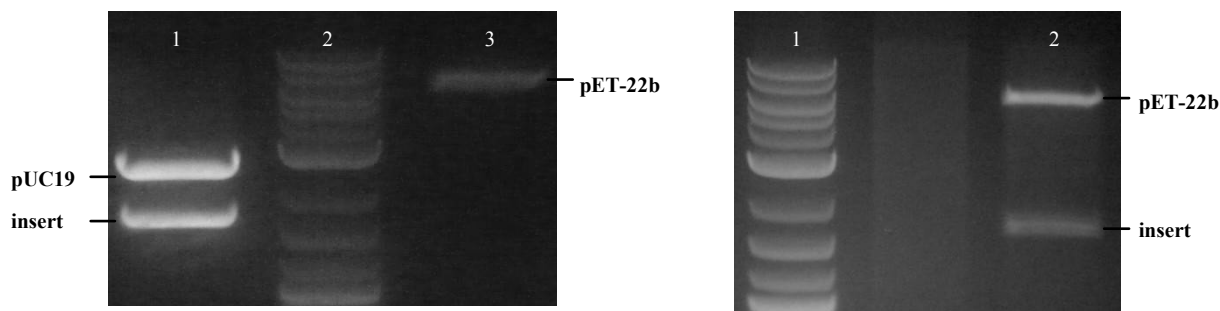
Ze zamrazené kultury buněk DH5α nesoucích ověřený konstrukt 1A2/pUC byla připravena kultura o vyšším objemu pro maxipreparaci DNA. Koncentrace a čistota připraveného vektoru je uvedena v tabulce 12.

**Tab. 12 Koncentrace a čistota vektoru 1A2/pUC získaného maxipreparací**

c [μg/ml]	$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}}$	$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{230} - A_{320}}$
520,5	1,87	2,22

#### 4.2.5 Přenesení genu CYP1A2 do plasmidu pET-22b

Gen *CYP1A2* byl vyštěpen z konstruktu 1A2/pUC pomocí restričních endonukleas NdeI a XhoI, kterými byl štěpen i plasmid pET-22b. Oba fragmenty byly přečištěny na agarosové elektroforéze a izolovány z gelu. Štěpené fragmenty ukazuje obrázek 31a.



**Obr. 31 Příprava vektoru 1A2/pET**

a) **1:** 1A2/pUC19 štěpený NdeI a XhoI;  
**2:** 2-log DNA ladder; **3:** pET-22b štěpený endonukleasami NdeI a XhoI (5363 bp)

b) **1:** 2-log DNA ladder; **2:** 1A2/pET štěpený endonukleasami NdeI a XhoI

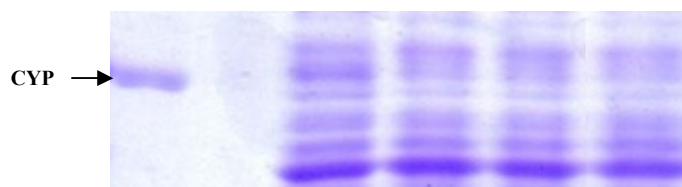
Následovala ligace obou fragmentů a transformace ligační směsi do buněk *E. coli* kmene DH5 $\alpha$ . Z kolonií pozitivních na ampicilinovou resistenci byl minipreparací izolován nový konstrukt nazvaný 1A2/pET, který byl ověřen štěpením endonukleasami NdeI a XhoI (obrázek 31b).

Vektor 1A2/pET byl transformován do expresních kmenů bakterií *E. coli* a byly s ním zahájeny expresní experimenty.

#### 4.2.6 Exprese cytochromu P450 1A2 pomocí vektoru 1A2/pET

Vektor 1A2/pET byl transformován do buněk *E. coli* kmenů BL-21 Gold (DE3) a BL-21-CodonPlus(DE3)-RIPL a transformované kolonie byly přeočkovány metodou single-cell. Po jejich nárůstu v malém množství LB média byly buňky rozděleny na alikvoty a zamrazeny s přidaným glycerolem v -80 °C. Tyto alikvoty byly použity pro expresní experimenty.

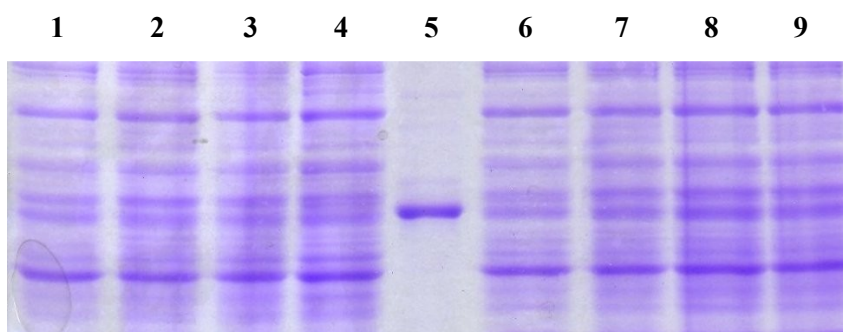
Nejprve byla provedena exprese při nárůstu buněk do OD<sub>600</sub> = 1, kdy byly indukovány přidáním IPTG do 1 mM koncentrace. Teplota byla nastavena na 30 °C a exprese byla zastavena po 24 hodinách. Obrázek 32 ukazuje, že pomocí elektroforézy nebyl pozorován nárůst proteinu odpovídající hmotnosti.



**Obr. 32** Exprese genu *CYP1A2* při 30°C

Zleva – králíčí CYP1A2; volná dráha; buňky BL-21 Gold (DE3) před indukci; buňky BL-21 Gold (DE3) po indukci; buňky BL-21-CodonPlus(DE3)-RIPL před indukci; buňky BL-21-CodonPlus(DE3)-RIPL po indukci

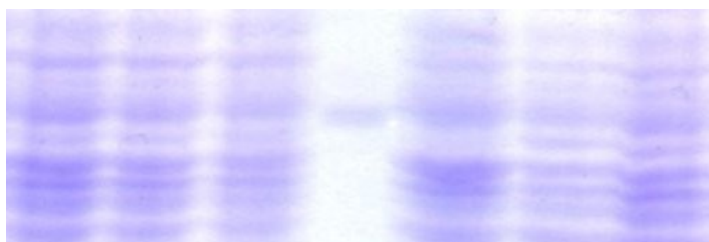
Další dva pokusy byly provedeny za téměř identických podmínek, pouze byly změněny expresní teploty. Při prvním pokusu byla teplota snížena na 24 °C, druhý pokus byl proveden za teploty 18 °C. Jak je možno vidět z obrázku 33, ani jeden z pokusů nebyl úspěšný.



**Obr. 33** Exprese genu *CYP1A2* při nižších teplotách

- |  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| 1: Buňky BL-21 Gold (DE3) před indukci | 6: Buňky BL-21 RIPL (DE3) před       |
| 2: (18 °C)                             | indukcí (18 °C)                      |
| 3: Buňky BL-21 Gold (DE3) po indukci   | 7: Buňky BL-21 RIPL (DE3) po indukci |
| (18 °C)                                | (18 °C)                              |
| 4: Buňky BL-21 Gold (DE3) před indukci | 8: Buňky BL-21 RIPL (DE3) před       |
| 5: (24 °C)                             | indukcí (24 °C)                      |
| Králíčí CYP1A2                         | 9: Buňky BL-21 RIPL (DE3) po indukci |
|  | (24 °C)                              |

Vektor 1A2/pET byl poté transformován do buněk OverExpress C41(DE3) a OverExpress C43(DE3), které jsou využívány pro exprese toxických proteinů. Byl proveden pokus s expresí trvající 48 hodin po indukci 1 mM IPTG při optické densitě  $OD_{600} = 1,6$  a teplotě 18 °C. Jak je patrné z obrázku 34, ani tento pokus nedopadl úspěšně.



**Obr. 34** Exprese genu *CYP1A2* v buňkách C41 a C43

Zleva – C41 před indukci; C41 po indukci (24 h); C41 po indukci (48 h); králičí *CYP1A2*; C43 před indukci; C43 po indukci (24 h); C43 po indukci (48 h)

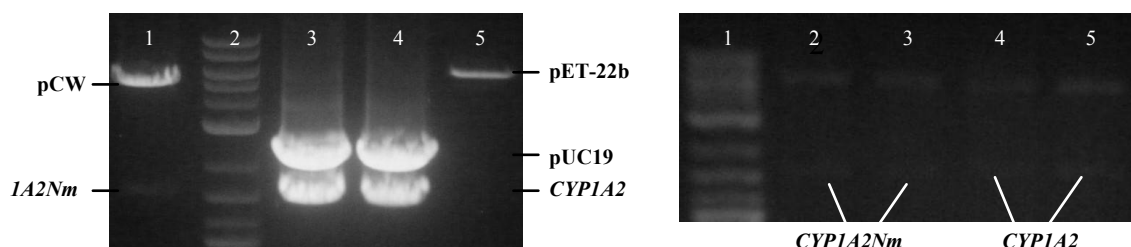
#### 4.2.7 Příprava vektorů 1A2/pCW a 1A2Nm/pET

Jelikož vektor 1A1/pET neposkytl uspokojivý expresní výsledek, bylo rozhodnuto gen *CYP1A2*, připravený v kapitole 4.2.2, vložit do plasmidu pCW.

Protože jsme ale nedisponovali původním plasmidem pCW, byla analyzována štěpící místa, která byla použita prof. Guengerichem pro přípravu zaslaných vektorů 1A1/pCW a 1A2Nm/pCW. Jako vhodný kandidát se ukázal druhý jmenovaný vektor, u něhož byl dle původní publikace vložen gen *CYP1A2Nm* do plasmidu s použitím endonukleasy NdeI na 5'-konci sekvence a HindIII na 3'-konci cDNA.

Stejná štěpící místa nese i připravený gen *CYP1A2*, který se nachází v klonovacím vektoru 1A2/pUC. Proto mohly být oba vektory štěpeny oběma endonukleasami a gen *CYP1A2* tak mohl být vložen do plasmidu pCW.

Při tomto dvojitém štěpení (obrázek 35a) byl využit i gen *CYP1A2Nm*, který se působením endonukleas uvolnil z plasmidu pCW a byl ligován do plasmidu pET, čímž byl připraven další vektor nazvaný 1A2Nm/pET. Připravené vektory byly ověřeny kontrolní restrikcí pomocí endonukleas NdeI a Xho I (obrázek 35b).



**Obr. 35** Příprava vektorů 1A2/pCW a 1A2Nm/pET

a) 1: štěpený 1A2Nm/pCW; 2: marker 2-log DNA ladder; 3: štěpený 1A2/pUC; 4: štěpený 1A2/pUC; 5: štěpený pET-22b

b) 1: marker 2-log DNA ladder; 2, 3: 1A2Nm/pET štěpený NdeI a HindIII; 4,5 : 1A2/pCW štěpený NdeI a HindIII

Plasmidy 1A2Nm/pCW a 1A2/pCW byly z *E. coli* kmene DH5 $\alpha$  izolovány ve vyšším množství použitím midipreparace DNA. Koncentraci preparátů a jejich čistotu ukazuje tabulka 13.

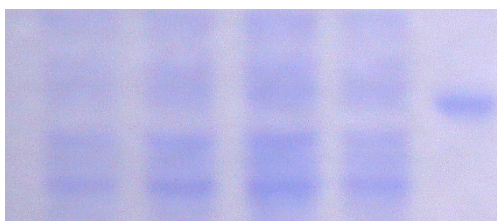
**Tab. 13 Koncentrace a čistota vektorů 1A2Nm/pCW a 1A2/pCW**

Vektor	c [ $\mu\text{g/ml}$ ]	$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}}$	$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{230} - A_{320}}$
1A2Nm/pCW	56,5	1,86	1,21
1A2/pCW	57,5	1,83	1,06

Ačkoliv nelze získaný vektor 1A2/pCW a zaslaný vektor 1A2Nm/pCW rozlišit bez sekvenace DNA, jejich odlišnost se projevila při expresních pokusech.

#### 4.2.8 Exprese cytochromu P450 1A2 pomocí dalších vektorů

Nejprve byl proveden expresní pokus s vektorem 1A2Nm/pET, který byl transformován do bakterií BL-21 Gold (DE3) a BL-21-CodonPlus(DE3)-RIPL. Ty byly následně inkubovány v LB médiu do nárůstu optické denzity  $\text{OD}_{600} = 1$  a poté byla provedena indukce přidáním IPTG do 1 mM koncentrace. Teplota při expresi byla nastavena na 18 °C. Protože však tento pokus nedopadl úspěšně (obrázek 36), byly další pokusy prováděny již jen s vektory odvozenými od plasmidu pCW, které byly již dříve použity k produkci cytochromů P450 .



**Obr. 36 Exprese genu *CYP1A2Nm* pomocí vektoru 1A2Nm/pET**

Zleva – buňky BL-21 RIPL před indukcí; buňky BL-21 RIPL po indukci; buňky BL-21 Gold před indukcí; buňky BL-21 Gold po indukci; králičí CYP1A2

V následující pokusné expresi byly vektory 1A2/pCW a 1A2Nm/pCW transformovány do buněk *E. coli* kmene DH5 $\alpha$ , z nichž byla druhý den přepíchnutím do 5 ml LB média připravena startovací kultura. Ta byla zředěna 500 ml LB média a

inkubována do nárůstu buněk do optické denzity  $OD_{600} = 0,8$ . Po dosažení optické denzity byly buňky indukovány 1 mM IPTG, načež následovala 48 hodinová exprese při 30 °C. Již po sklizení buněk byl znatelný rozdíl mezi oběma kulturami, neboť buňky transformované vektorem 1A2/pCW měly sytě červenou barvu. Buňky pak byly sonikovány a podrobeny frakční centrifugaci. Po přípravě membránové frakce ale bylo možno pozorovat, že červená barva zůstala v supernatantu. Vzorek supernatantu byl podroben stanovení cytochromu P450 a ve spektru byl zachycen pík při 442 nm. Jak je vidět z obrázku 37, množství proteinu při produkci v LB médiu však nebylo příliš vysoké.



**Obr. 37 Výsledky exprese CYP1A2 z plasmidů odvozených od pCW**

a) 1A2/pCW v LB médiu (500 ml)

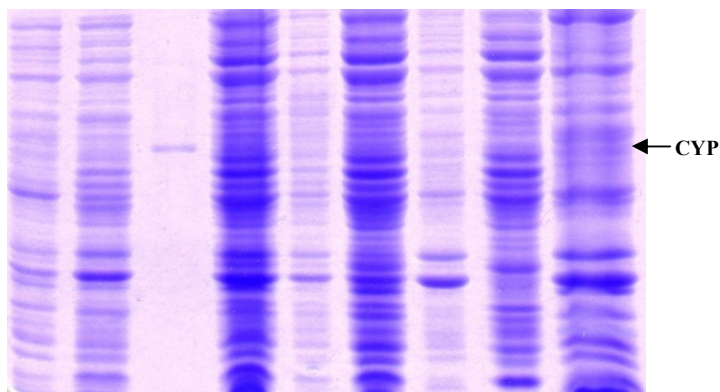
b) 1A2Nm/pCW (500 ml)

zleva – supernatant z ultracentrifugace (5000 x ředěno); králíčí CYP1A2; membrány (1000x ředěno); membrány (500x ředěno)

zleva – supernatant z ultracentrifugace (5000 x ředěno); králíčí CYP1A2; membrány (1000x ředěno); membrány (500x ředěno)

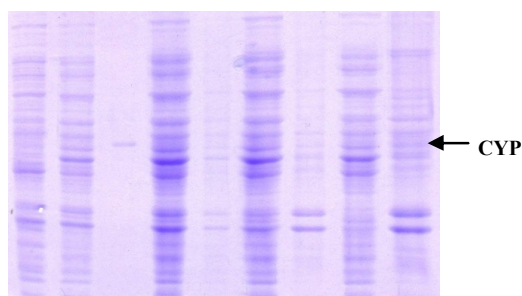
Jelikož exprese v LB médiu neposkytla protein snadno viditelný na elektroforéze, byla provedena pokusná exprese v modifikovaném TB médiu (viz kapitola 3.3.21). Dále byl snížen objem média na 250 ml ve 2 litrové Erlenmayerově láhvi a byly převzaty optimální podmínky z [96]. Buňky byly inkubovány do nárůstu optické denzity  $OD_{600} = 0,6$  a následně byly indukovány 1 mM IPTG (s paralelním přidáním ALA do 0,5 mM koncentrace). Poté byly ponechány třepat při teplotě 32°C po 32 hodin. Dále byl proveden stejný pokus s plasmidem 1A2Nm/pCW v LB médiu (obrázek 39a), které bylo modifikováno dodáním stejných aditiv jako TB médium. Jak ukazují výsledky na obrázcích 38 a 39, produkce v TB médiu poskytla vyšší množství N-terminálně modifikovaného proteinu vázaného v membránách. Produkce s vektorem 1A2/pCW za stejných podmínek však viditelné množství proteinu neposkytla.





**Obr. 38 Produkce CYP1A2 v modifikovaném TB médiu**

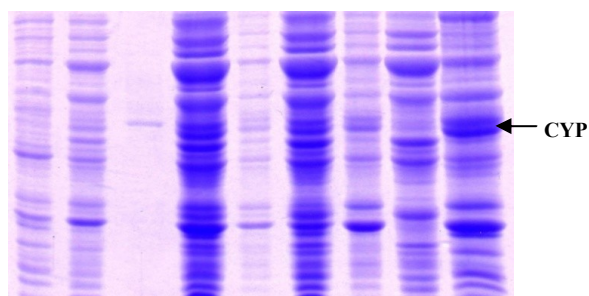
Zleva – buňky před indukcí; buňky po indukcí; králičí CYP1A2; sonikované buňky (5000x ředěno); nerozbité buňky (5000x ředěno); supernatant 18000g (5000x ředěno); inkluzní tělíska (5000x ředěno); cytosol (5000x ředěno); membrány (1200x ředěno)



**Obr. 39a Produkce CYP1A2Nm v modifikovaném LB médiu**

Zleva – buňky před indukcí; buňky po indukcí; králičí CYP1A2; sonikované buňky (5000x ředěno); nerozbité buňky (5000x ředěno); supernatant 18000g (5000x ředěno); inkluzní tělíska (5000x ředěno); supernatant 265000 g (5000x ředěno); membrány (1200x ředěno)

**Obr. 39b Produkce CYP1A2Nm v modifikovaném TB médiu**



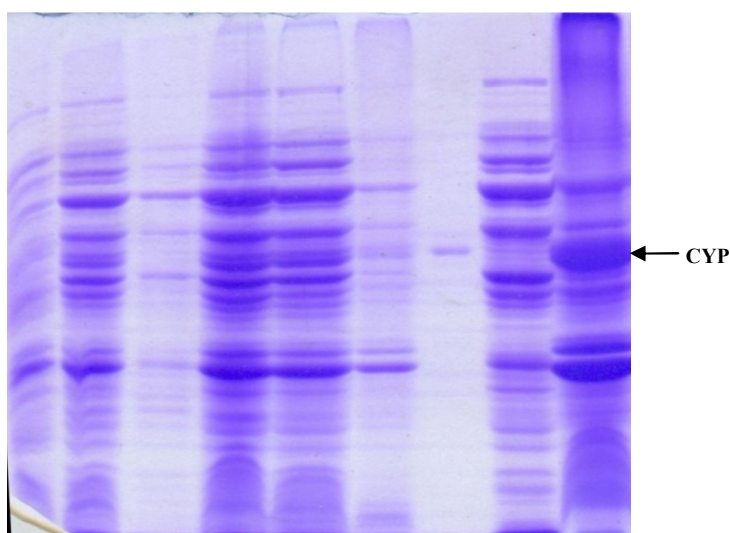
Byl také ověřován postup, kdy byly buňky před vlastní dezintegrací ošetřeny lysozymem, což vedlo k tvorbě sferoplastů. Tento postup byl v literatuře popsán jako vhodný pro izolaci cytochromů P450 [128].

### **4.3 Izolace cytochromu P450 1A2Nm**

Byly provedeny dvě izolace, přičemž při každé byly zvoleny odlišné izolační postupy.

### 4.3.1 První izolace CYP1A2Nm

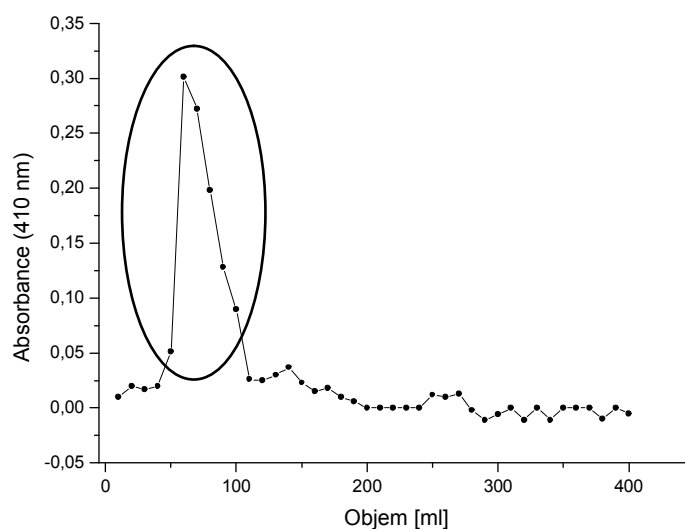
Produkce CYP1A2 byla provedena v 1 litru modifikovaného TB média a po nárůstu buněk transformovaných buněk DH5 $\alpha$  do optické denzity OD<sub>600</sub> = 0,6 byl přidán IPTG do koncentrace 1 mM a produkční teplota byla stanovena na 32 °C. Zároveň byla přidána ALA do 0,5 mM koncentrace. Produkce byla zastavena po 32 hodinách. Z buněk byly připraveny sferoplasty a ty byly podrobeny frakční centrifugaci. Jak plyne z přehledu na obrázku 40, sonikací byla dezintegrována většina sferoplastů (dráha 5) a cílového proteinu bylo ztraceno relativně malé množství (dráha 6). Většina CYP1A2Nm se nacházelo v membránách.



**Obr. 40 Produkce CYP1A2Nm a frakční centrifugace pro první izolaci**

Zleva – buňky před indukcí; buňky po indukcí; buněčné stěny (40000x ředěno); sferoplasty (16000x ředěno); sonikované sferoplasty (40000x ředěno); inkluzní tělíska a nerozbité buňky (20000x ředěno); králíčí CYP1A2; cytosol (20000x ředěno); membrány (2000x ředěno);

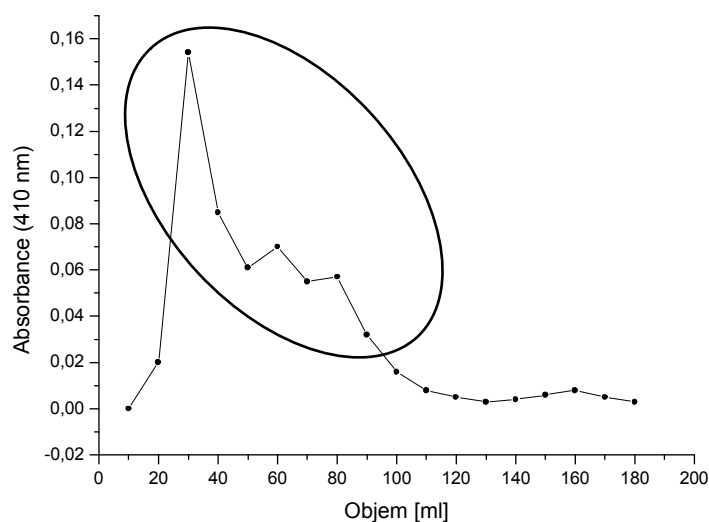
Získané membrány byly solubilizovány a solubilizát byl nanesen na kolonu DEAE Sepharosy CL-6B (1,5 cm x 16 cm). Frakce obsahující hemoprotein vytékající při promývání kolony (frakce 5-10; označené na obrázku 41) byly ihned spojeny a naředěny na objem 100 ml. Eluční profil na obrázku 41 naznačuje, že hemoprotein (CYP1A2Nm) protekl kolonou při promývání ekvilibračním pufrem.



**Obr. 41 Eluční profil frakcí z DEAE Sepharosy CL-6B**

Roztoky z frakcí 5 až 10 byly spojeny, zředěny a použity při další práci.

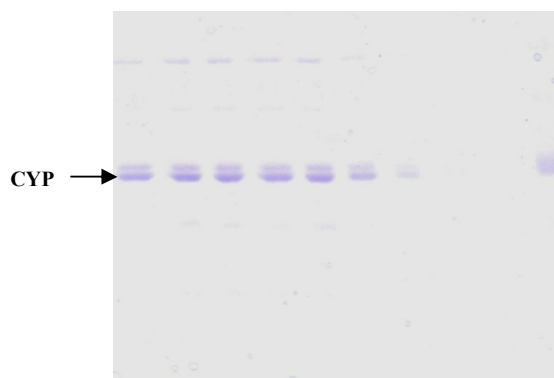
Naředěný roztok byl nanesen na sloupec CM Sepharosy CL-6B (1,5 cm x 16 cm), na kterou se měl žádaný protein vázat. Detekcí absorbance při 410 nm ale bylo zjištěno, že protein se nezachytil a protekl při nanášení a promývání ekvilibračním pufrem. Frakce 3-9, označené v elučním profilu na obrázku 42, byly spojeny.



**Obr. 42 Eluční profil frakcí z CM Sepharosy CL-6B**

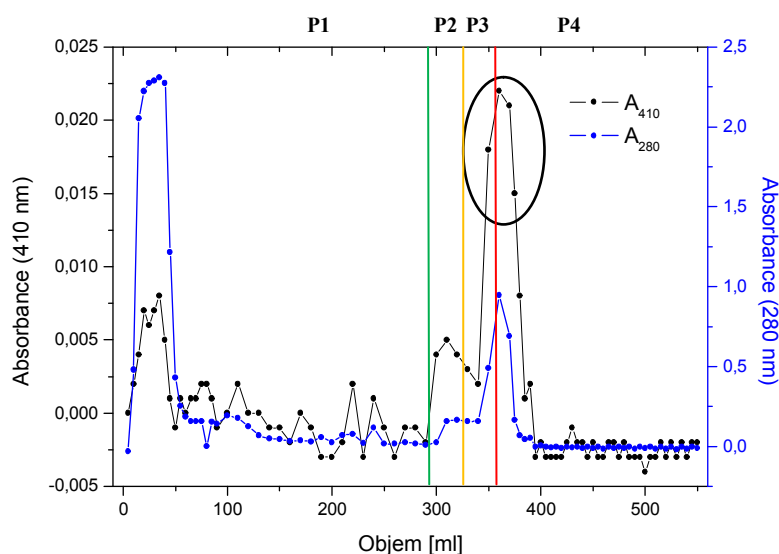
Roztoky z frakcí 3 až 9 byly spojeny, zahuštěny a použity při další práci.

Elektroforetický záznam vybraných frakcí ukazuje obrázek 43.



**Obr. 43 Vybrané frakce po chromatografii na CM Sepharose CL-6B**  
Zleva – frakce 3 až 9; frakce 10; frakce 2; králíčí CYP1A2

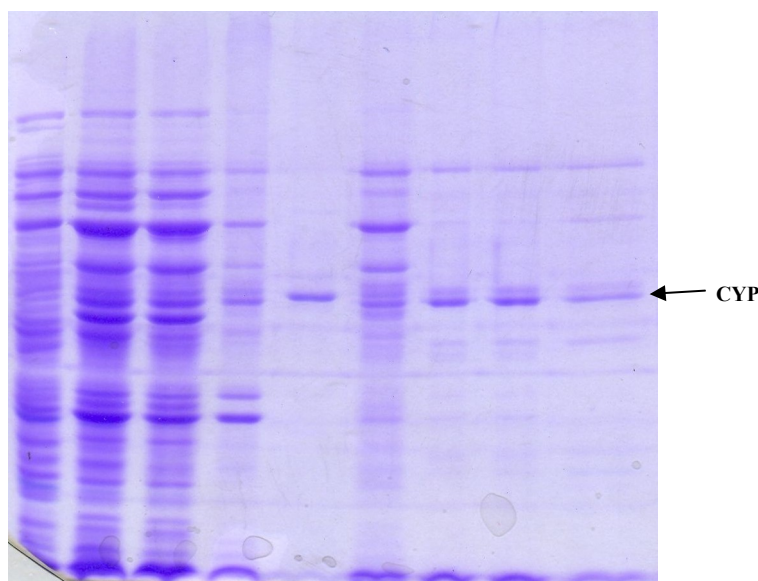
Frakce byly spojeny, zahuštěny v ultrafiltrační cele Amicon na 15 ml a nasazeny na kolonu hydroxylapatitu (1 cm x 10 cm). Na tomto nosiči se protein zachytil, ale začal se uvolňovat již při promývání druhým promývacím pufr. Eluční profil frakcí z hydroxylapatitové kolony ukazuje obrázek 44.



**Obr. 44 Eluční profil frakcí z kolony hydroxylapatitu**

Při elučním objemu 300 ml byl nasazen první promývací pufr, druhý promývací pufr byl nasazen u 330 ml a eluční pufr byl nasazen při 360 ml. Frakce odpovídající 350 až 380 ml byly spojeny a zahuštěny.

Frakce odpovídající elučnímu objemu 350 až 380 ml (obrázek 44, označené elipsou) byly spojeny, dialyzovány a zahuštěny na objem 2,2 ml. Při porovnání drah 6 až 9 na gelu ukazujícím celkový přehled izolace (obrázek 45) je patrné, že na DEAE Sepharose došlo k odstranění mnoha kontaminujících proteinů, zatímco na CM Sepharose a HAP nikoliv.



**Obr. 45 Celkový přehled izolace**

Zleva – buňky před indukcí; buňky po indukcí; sonikované sferoplasty (40000x ředěno); membrány (25000x) ředěno; králičí CYP1A2; solubilizát (10000x ředěno); spojené frakce po DEAE Sepharose CL-6B (6666x ředěno); spojené frakce po CM Sepharose CL-6B (3333x ředěno); frakce po koloně hydroxylapatitu (220x ředěno)

Pomocí programu ImageJ byly z elektroforézy získány údaje o celkovém množství proteinu odpovídajícího CYP1A2Nm jednotlivých izolačních krocích a také načistění při těchto izolačních krocích. Ztráty ve většině izolačních kroků byly nízké, k podstatným ztrátám CYP1A2Nm však došlo během solubilizace (73%), a pak na HAP koloně (96%) (Tabulka 13). Z hlediska načištění pak bylo nejefektivnějším krokem purifikace na DEAE Sepharose CL-6B.

**Tab. 14 Množství CYP1A2Nm a jeho čistota po izolačních krocích**

	Množství CYP1A2Nm [nmol]	Objem [ml]	Odhad čistoty [%]	Koncentrace CYP1A2Nm dle CO spektra [μM]
Buňky po indukcí	300	1000	7	X
Sonikované sferoplasty	300	40	7	X
Membrány	240	10	8	X
Solubilizát	65	50	8	X
Frakce po DEAE Sepharose CL-6B	62	100	21	X
Frakce po CM Sepharose CL-6B	47	50	21	2,0 <sup>a</sup>
Frakce po HAP	2	2,2	21	2,3

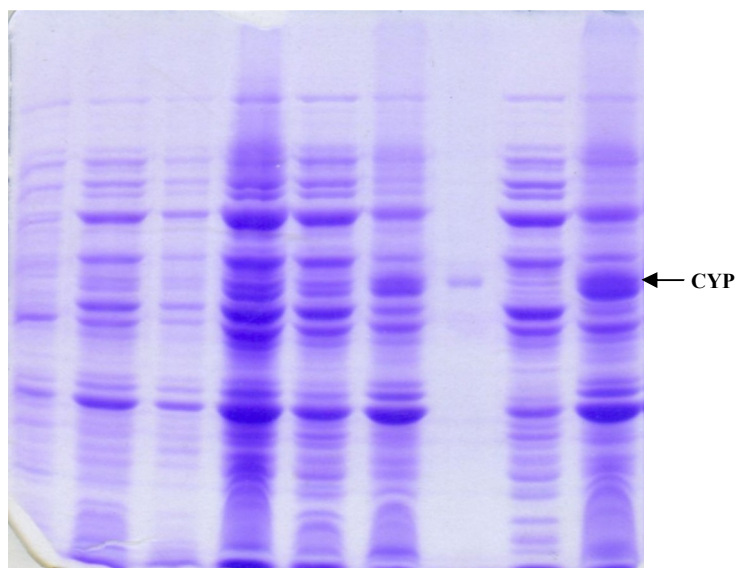
X – spektra nebyla měřena

a - ve spektru byl zachycen pík při 420 nm

Jak je možné pozorovat na elektroforéze přehledu celkové izolace, byly načištěny dva podobně velké proteiny. Dalším rozbořením tohoto jevu se zabývá diskuse.

### 4.3.2 Druhá izolace CYP1A2Nm

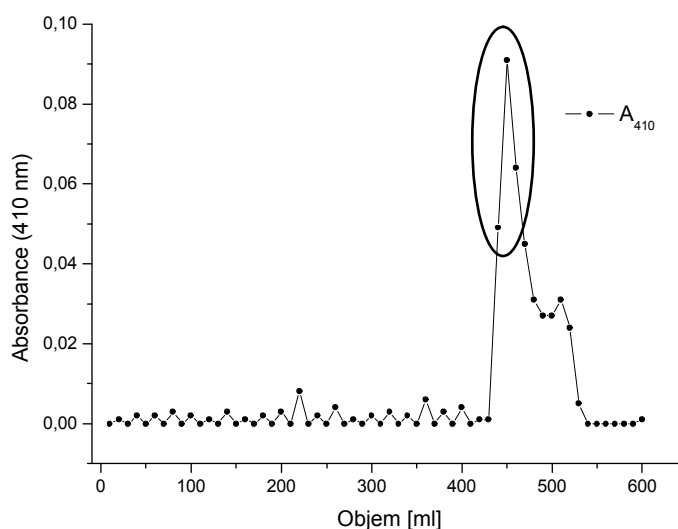
Produkce CYP1A2Nm pro druhou izolaci byla opět provedena v 1 litru modifikovaného TB média a po nárůstu optické hustoty  $OD_{600} = 0,6$  byly transformované buňky DH5 $\alpha$  indukovány IPTG do koncentrace 1 mM. V tomto případě ale nebyla přidána ALA, jelikož nebyla dostupná. Produkce byla přesto uskutečněna po přihlédnutí k informaci, že úroveň exprese 1A2Nm pomocí plasmidu pCW není ovlivňována přítomností externě dodaného hemového prekursoru [129]. Produkce probíhající při 32 °C byla opět zastavena po 32 hodinách a z buněk byly připraveny sferoplasty, které byly podrobeny frakční centrifugaci. Z elektroforetického gelu zobrazujícího sferoplasty a jednotlivé frakce plyne, že v tomto případě neproběhla sonikace sferoplastů bez ztrát cílového proteinu a část sferoplastů dezintegraci nepodlehla (obrázek 46, dráha 6). Přesto bylo množství CYP1A2Nm v membránové frakci (dráha 9) dostatečné pro izolaci.



**Obr. 46 Produkce CYP1A2 pro druhou izolaci**

Zleva – buňky před indukcí; buňky po indukcii; buněčné stěny (40000x ředěno); sferoplasty (16000x ředěno); sonikované sferoplasty (40000x ředěno); inkluzní tělíska a nerozbité buňky (20000x ředěno); králičí CYP1A2; cytosol (20000x ředěno); membrány (5000x ředěno)

Membrány byly solubilizovány a solubilizát byl nanesen na kolonu DEAE Sepharosy CL-6B (2,5 cm x 20 cm). Na vrcholu kolony se zformovala tmavěžlutá zóna a protein zůstal vázán na nosiči. Dle původního záměru měl být nosič promyt roztokem o slabé iontové síle k uvolnění slabě vázaných proteinů a následně měl být CYP1A2Nm eluován pomocí gradientu iontové síly. Malé množství proteinu se ale uvolnilo už v několika frakcích již při promývání roztokem o slabší iontové síle (obrázek 47).

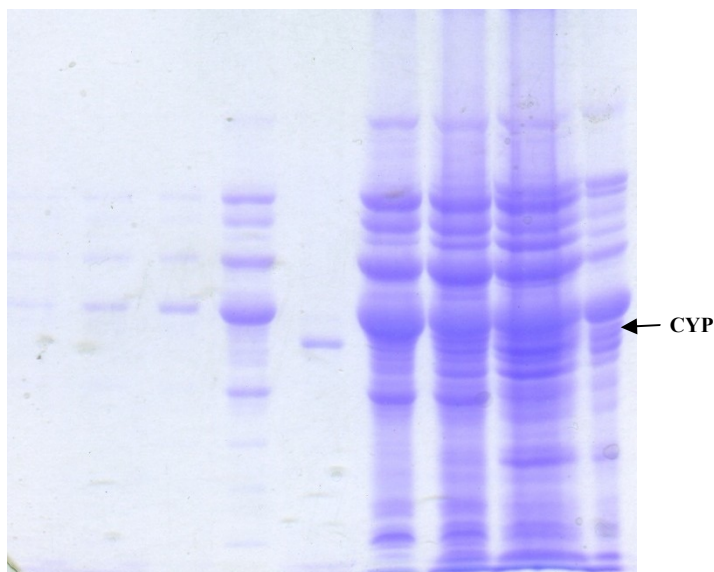


**Obr. 47** Eluční profil frakcí z DEAE Sepharosy CL-6B

Zobrazen eluční profil z promývání ekvilibračním pufrem, gradientová eluce zobrazena není, jelikož při ní nebyl eluován žádný hemoproteinu.

Pro eluci zbývajícího proteinu byl nasazen gradient iontové síly, ale hemoprotein nebyl eluován. Eluce bylo dosaženo až při závěrečném promývání roztokem o vysoké iontové síle, což ukazuje obrázek 48. Takto získaný protein byl ale vzhledem k vysoké iontové síle elučního roztoku považován za denaturovaný a nebylo s ním dále pracováno.

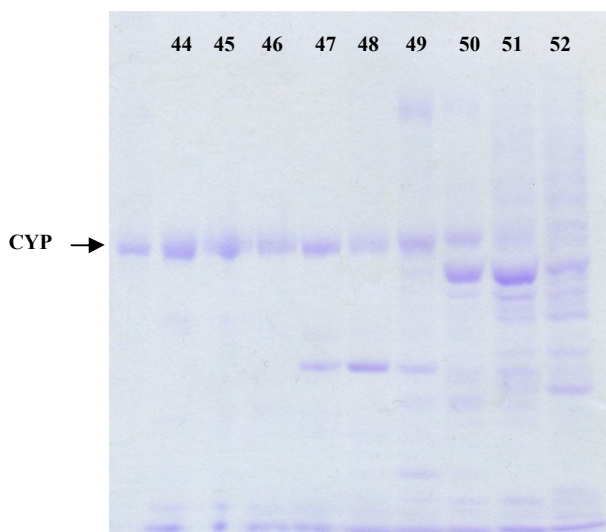




**Obr. 48 Frakce získané z DEAE Sepharosy promýváním roztokem o vysoké iontové síle**

Zleva – frakce odpovídající elučnímu objemu 1680 až 1720 ml; králičí CYP1A2; frakce odpovídající elučnímu objemu 1730 až 1760 ml.

Proteinové složení získaných frakcí obsahujících hemoprotein ukazuje obrázek 49. Frakce 44 až 46 (obrázek 47, označené elipsou) byly, narozdíl od následujících frakcí, nejvíce načištěné a bylo s nimi tedy dále pracováno.



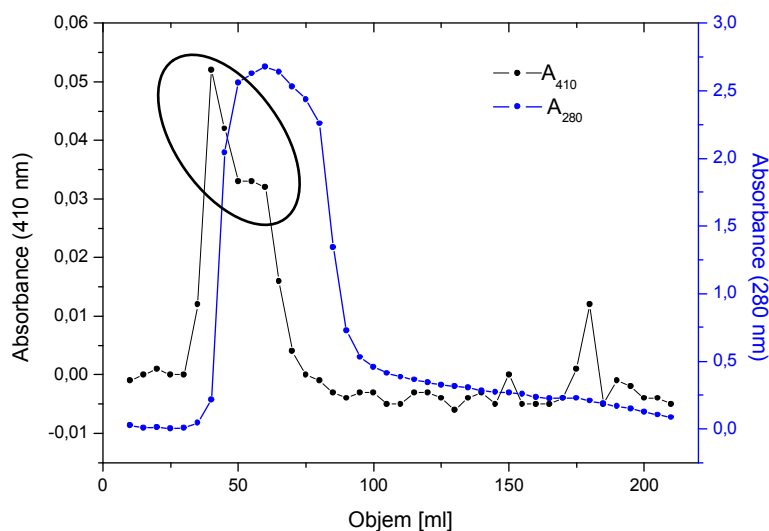
**Obr. 49 Frakce z DEAE Sepharosy CL-6B**

Zleva – králičí CYP1A2; frakce 44 až 52 (odpovídající elučnímu objemu 440 až 520 ml)

Frakce 44 až 46 byly spojeny a zahuštěny na objem 2,4 ml. Poté byly naneseny na kolonu Sephadexu G-100 (1,5 cm x 50 cm), která byla po nanesení promývána



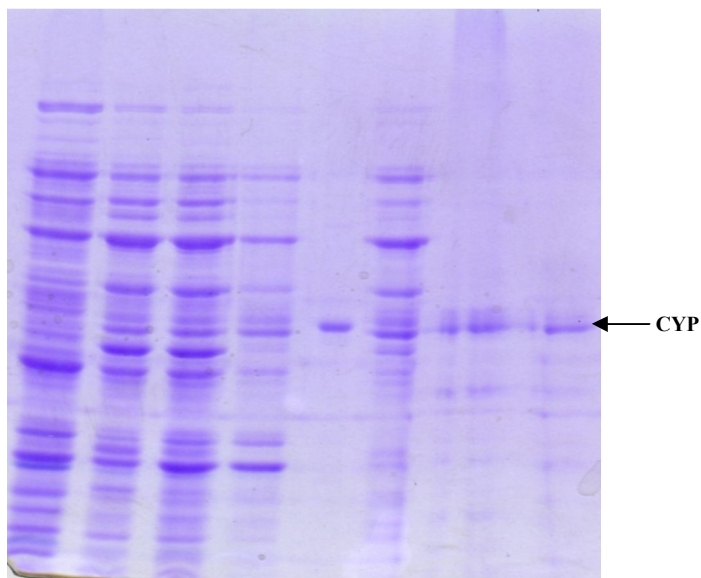
ekvilibračním pufrem. Eluční profil (obrázek 50) ukazuje, že CYP1A2Nm byl eluován z kolony velmi brzy.



#### Obr. 50 Eluční profil frakcí ze Sephadexu G-100

Byly spojeny frakce odpovídající elučnímu objemu 40 až 60 ml.

Spojeny a zahuštěny byly frakce 7 až 11, které odpovídaly elučnímu objemu 40 až 60 ml (obrázek 49, označeny elipsou). Získaný preparát byl zahuštěn na 1,6 ml a dialyzován. Přehled izolace je zobrazen na obrázku 51.



#### Obr. 51 Přehled izolačních kroků

Zleva – buňky před indukcí; buňky po indukcí; sonikované sferoplasty (40000x ředěno); membrány (25000x) ředěno; králíčí CYP1A2; solubilizát (16666x ředěno); spojené frakce po DEAE Sepharose CL-6B (480x ředěno); spojené frakce po Sephadexu G-100 (800x ředěno).

ředěno)

Pomocí programu ImageJ byly z elektroforézy získány údaje o množství proteinu odpovídajícího CYP1A2Nm a načistění při jednotlivých izolačních krocích (Tabulka 15). Nejvyšší ztráta byla zaznamenána při chromatografii na DEAE nosiči, kdy bylo ztraceno 95 % proteinu, zároveň však v tomto kroku došlo k podstatnému načištění proteinu.

**Tab. 15 Množství CYP1A2Nm a jeho čistota po izolačních krocích**

	Množství CYP1A2Nm [nmol]	Objem [ml]	Odhad čistoty [%]	Koncentrace CYP1A2Nm dle CO spektra [μM]
Buňky po indukci	400	1000	4	X
Sonikované sferoplasty	250	40	5	X
Membrány	200	10	10	X
Solubilizát	170	50	11	X
Frakce po DEAE Sephrose CL-6B	9	2,4	32	0,3
Frakce po Sephadexu G-100	8	1,6	29	2,2

X – spektra nebyla měřena

## 5. Diskuse

Heterologní exprese cytochromů P450 v bakteriích *Escherichia coli* se po srovnání s ostatními expresními systémy považuje za nejefektivnější zdroj rekombinantního proteinu. Jeho výhodou je kratší doba produkce, nižší cenové nároky a vyšší množství získaného proteinu a v neposlední řadě i dostupnost lidských orthologů těchto enzymů.

Gen pro cytochrom P450 1A1 byl získán v podobě nespecifikovaného genu vloženého do plasmidu pCW od Prof. Guengeriche. Vložený gen byl podroben sekvenaci, která odhalila změnu na N-konci proteinu. Záměna leucinu za alanin byla provedena po vzoru „Barnesovy sekvence“ (obrázek 7 na straně 23) [88]. Srovnáním s N-koncovým pravidlem pro *E. coli*, které dle aminokyselin umístěných na N-konci studovaného proteinu predikuje jeho poločas života *in vivo* před rozštěpením proteasami, je zřejmé, že záměna těchto aminokyselin je ve shodě se závěry zmíněného pravidla [130].

Druhou změnou byla konsenzuální mutace v první polovině proteinu, kdy je isoleucin mutován na leucin. Tato konzervativní mutace však pravděpodobně nemá žádný vliv na vlastnosti proteinu a byla tedy zachována. Bylo tedy rozhodnuto o amplifikaci genu beze změn v primární sekvenci jeho proteinového produktu a jeho následné vložení do plasmidů používaných v naší laboratoři. Návrh primerů respektoval stabilizující změnu druhé aminokyseliny, ale pozměňoval čtvrtý triplet (kódující prolin) na kodon vybraný dle tabulky preferovaných expresních kodonů organismu *Escherichia coli* [121]. Dále byl změněn terminační kodon pro optimalizaci teploty tání samotného primeru.

Gen byl úspěšně amplifikován pomocí PCR a po vyštěpení zaligován do vysokokopiového plasmidu pUC19 určeného k získání vyššího množství genu a k jeho sekvenci. Ta potvrdila shodu sekvence s očekávanou sekvencí genu *CYP1A1*, zároveň byly potvrzeny provedené změny a gen byl proto vložen do expresního plasmidu pET-22b. Tento konstrukt byl pak verifikován kontrolním štěpením a následně funkčně ověřen v pěti kmenech *E. coli*. Pomocí SDS-PAGE byla sledována exprese proteinu odpovídajícího CYP1A1, vysoká produkce byla jen v kmeni BL21-Gold (DE3), následný experiment však ukázal, že je většina proteinu přítomna ve formě inkluzních tělísek, jejichž tvorbu se ani se snížením koncentrace IPTG ani snížením teploty nepodařilo potlačit. Bylo tedy přikročeno k expresi CYP1A1 v původním plasmidu pCW. Produkce v něm je nižší, ale podstatná část požadovaného proteinu je přítomna i v membránové frakci. CYP1A1 byl z membrán

uvolněn solubilizací a následně purifikován na sloupci DEAE Sepharosy, z ní se jej však ani vysokou intenzivou silou nepodařilo eluovat. Z časových důvodů pak nebylo možné izolaci CYP1A1 opakovat.

Další část práce, která se soustřeďuje na získání rekombinantního lidského CYP1A2, opět vychází z plasmidu pCW nesoucí modifikovaný lidský gen pro CYP1A2 od prof. Guengeriche. Gen byl sekvenován a byly zjištěny rozsáhlé modifikace na N-terminálním konci jeho produktu, především byla lidská N-terminální membránová část nahrazena modifikovanou sekvencí pocházející z hovězího CYP17A1. Cílem práce bylo připravit CYP1A2 pokud možno identický s nativní lidskou formou, neboť bylo ukázáno že i relativně malá modifikace několika N-terminálních aminokyselin mění kinetické parametry při metabolismu vybraných substrátů [96]. Proto byla počáteční sekvence genu změněna pomocí PCR tak, aby primární sekvence proteinu byla identická s lidským proteinem, zároveň byla sekvence DNA optimalizována pro heterologní expresi v *E. coli* a také na eliminaci nežádoucích sekundárních struktur v mRNA. Výsledný konstrukt byl potvrzen sekvenací a gen byl poté přenesen do expresního plasmidu pET-22b. Ten byl následně ověřen štěpením a použit k transformaci 5 kmenů *E. coli* jako v předchozím případě. Bohužel však žádný z kmenů nevykázal znatelnou expresi očekávaného proteinu. Existovala ještě možnost, že N-terminální modifikace je nezbytná pro produkci CYP1A2 v *E. coli*. Proto byl do plasmidu pET22b přenesen také původní gen kódující modifikovaný chimérický CYP1A2 (CYP1A2Nm), ani jeho exprese však nebyla detekována. Nezbývalo tedy než použít vektory založené na plasmidu pCW, kromě původního CYP1A2 s N-terminální modifikací byl připraven i konstrukt obsahující opravený gen kódující přirozený lidský CYP1A2. Geny byly exprimovány v kmeni DH5 $\alpha$  a to jak v LB, tak i v TB mediu. Významná produkce proteinu odpovídajícího CYP1A2 byla zjištěna u obou konstruktů a to v TB mediu modifikovaném dle [96]. Jak se však ukázalo při frakční centrifugaci, CYP1A2 se neinkorporoval do membrány a zůstal v cytosolární frakci, zatímco CYP1A2Nm byl z podstatné části přítomen v membránové frakci. Zdá se tedy, že N-terminální modifikace je nutná pro inkorporaci lidského CYP1A2 do bakteriální membrány. Proto bylo pokračováno v izolaci s použitím modifikovaného genu CYP1A2Nm.

Při solubilizaci obou forem proteinu byl do směsi dodán  $\alpha$ -naftoflavon, inhibitor cytochromů P450 podrodiny 1A. Jak prokázaly optimalizace v [78], přítomnost této látky je nutná pro protekci proteinu CYP1A2Nm před denaturačním účinkem detergentů. V dalších publikacích byl použit nejen pro ochranu rekombinantního CYP1A1 [88], ale též při použití jiného detergentu [96]. Při porovnání obou izolací CYP1A2Nm je znatelný rozdíl v množství solubilizovaného proteinu, kdy bylo v prvním případě solubilizováno přibližně 25 % proteinu vázaného v membránách, zatímco při druhé izolaci činil výtěžek tohoto kroku asi 80 %. Je možné, že k lepšímu výtěžku v druhé izolaci napomohla šetrnější sonikace sferoplastů. Přestože při zpracování druhé vysokoobjemové produkce nedošlo k tak dokonalé dezintegraci sferoplastů jako v prvním případě a část jich byla ztracena v peletě s inkluzními tělísky (obrázek 46 na straně 85, dráha 6), bylo v druhém kroku získáno jen o 20% nižší množství CYP1A2 vázaného v membránové frakci.

V řadě prací [78,88,94,96] byl inhibitor  $\alpha$ -naftoflavon dodáván do solubilizace, i do roztoku určeného pro chromatografii na DEAE nosiči, neboť i ten obsahoval vysoké množství detergentů. Jelikož byla snaha se inhibitoru zbavit, aby byl ve finálním preparátu obsažen v co nejnižším množství, nebyl při chromatografii v této práci použit a namísto toho byly z roztoku vyřazeny detergenty. Při první izolaci byla tedy kolona DEAE nosiče ekvilibrována roztokem bez detergentů, a jak je vidět z přehledu izolace (tabulka 14 na straně 84), většina proteinu byla po nanesení eluována již tímto promývacím pufrem. Zbylé izolační kroky kopírovaly původní práci - chromatografie na CM nosiči měla protein zadržet na koloně a zbavit preparát dalších nečistot. To se však nestalo, jelikož se preparát na CM Sepharose nezachytil. Vazbě na CM nosič by zabraňovala vyšší koncentrace detergentu, ale ty nebyly přítomny v použitých pufrech již od solubilizace. Nicméně, vzhledem k elučnímu profilu z DEAE nosiče (obrázek 41 na straně 82) je možné, že detergent zůstal v preparátu zachován. Přesto i po dvojnásobném naředění, které mělo za cíl snížit nejen iontovou sílu, ale především koncentraci případných detergentů, k zachycení na CM nosič nedošlo. Je také možné, že přídavek pufru pro CM Sepharosu (pH 6,5) k původnímu alkaličtějšimu (pH 7,4) nesnížil výsledné pH dost na to aby k vazbě na nosič došlo.

Po tomto kroku byl preparát chromatograficky separován na koloně hydroxylapatitu, který je používán nejen k odmytí detergentů, ale i zbývajícího  $\alpha$ -naftoflavonu. Tento krok již není v původní práci zmíněn, ale vzhledem ke snaze získat preparát bez velkého množství inhibitoru bylo rozhodnuto o jeho provedení. Jak je možno

vidět z tabulky 14, drtivá většina proteinu byla na koloně ztracena. V dalším pokusu již tento krok nebyl používán.

Při druhé izolaci byly do ekvilibračního roztoku přidány detergenty (cholát sodný a Triton X-100), a to do koncentrace přibližně 1,5x, respektive 3x nižší než při solubilizaci. Toto rozhodnutí sledovalo zisk vyššího množství proteinu z chromatografie na DEAE nosiči. Oproti původnímu očekávání se ale CYP1A2Nm na kolonu zcela navázal a byl pak eluován již při promývání při slabé iontové síle (100 mM KCl). Jeho množství však odpovídalo asi jen 1/10 původního množství (Tabulka 15 na straně 89). Fakt, že většina proteinu byla ztracena při chromatografii a byla eluována až při vysoké iontové síle může být vysvětlena jeho agregací v ekvilibračním roztoku o slabší iontové síle. Mohlo také dojít k částečné denaturaci proteinu způsobené přítomností detergentů a nepřítomností  $\alpha$ -naftoflavonu.

Tři získané frakce z DEAE chromatografie, které vykazovaly vyšší stupeň načištění (obrázek 49 na straně 87) byly spojeny, a protože obsahovaly především nečistoty o nižší molární hmotnosti než má CYP1A2Nm, byly podrobeny gelové filtraci na Sephadexu G-100 za účelem odstranění těchto nečistot o rozdílné molekulové hmotnosti. Z přehledu izolace (obrázek 51 na straně 88) je vidět, že došlo naopak k odstranění nečistot o vyšší molární hmotnosti.

Zajímavostí izolace proteinu CYP1A2Nm je přítomnost proteinu o nepatrně vyšší molekulové hmotnosti ve většině získaných preparátů (viz například obrázek 43 na straně 83). Tento protein byl pozorován již v předešlých provedených izolacích v [78,94]. Při provedení imunochemické identifikace CYP1A2Nm pomocí protilátek proti lidské formě CYP1A2 byly protilátkami označeny oba proteiny. Při pokusu o zjištění sekvence proteinu pomocí Edmanovy sekvenace se ukázalo, že oba proteiny měly blokovaný N-konec sekvence neodštěpeným N-formylmethioninem [78]. Sekvenaci se podařilo uskutečnit po hydrolyze, ale sekvenován byl pouze majoritní protein [94]. Identita minoritní formy tedy zůstává prozatím neodhalena.

Izolace nemodifikovaných lidských forem cytochromů P450 1A1 a 1A2 tak, jak byla plánována v zadání práce, se ukázala být poměrně obtížnou především kvůli problematické stabilitě obou proteinů během produkce v hostitelském organismu nebo

během chromatografické purifikace. Vhodnou kombinací zde ověřených izolačních kroků by mělo být možné získat dostatečné množství upraveného lidského CYP1A2 a při použití  $\alpha$ -naftoflavonu i lidského CYP1A1. Tato a další práce je plánována v rámci navazujícího doktorského studia.

## 6. Závěr

Předkládaná práce popisuje a rozšiřuje postupy související s heterologní expresí a izolací lidských forem cytochromů P450 1A1 a 1A2, které jsou nezbytné pro provádění metabolických studií a pro studium jejich interakcí s lidskou NADPH: cytochrom P450 oxidoreduktasou a s lidským cytochromem b<sub>5</sub>. Konkrétní výsledky lze shrnout následovně:

1. Byly připraveny a ověřeny 2 vektory nesoucí minimálně upravený gen pro lidský cytochrom P450 1A1 založené (i) na klonovacím plasmidu pUC19 a (ii) na účinném expresním plasmidu pET-22b. Produkce proteinu v tomto vektoru však byla příliš vysoká a spojená s tvorbou inkluzí. Byla však úspěšně provedena exprese nativního proteinu ve vektoru založeném na původním plasmidu pCW nesoucím upravený gen pro cytochrom P450 1A1.
2. Byly připraveny a ověřeny 4 vektory nesoucí upravený gen pro lidský cytochrom P450 1A2 založené (i) na klonovacím plasmidu pUC19, (ii) na účinném expresním plasmidu pET-22b a (iii) původním plasmidu pCW avšak s genem s minimální modifikací. Vysoká produkce solubilního proteinu byla zjištěna v plasmidu pCW, tvořený protein se však neinkorporoval do membrány. Nakonec byla úspěšně provedena exprese nativního membránového cytochromu P450 1A2 ve vektoru založeném na původním plasmidu pCW.
3. Exprimovaný membránový cytochrom P450 1A2 s N-terminální modifikací by solubilizován a částečně purifikován. Byly položeny základy pro izolaci cytochromů P450 rodiny 1A bez vysoké spotřeby inhibitoru, potenciálně interferujícího a metabolickými studiemi.

Předkládaná práce doplňuje a rozšiřuje v laboratoři již zavedené metodiky molekulární biologie a izolace proteinů a zároveň přispívá k řešení grantu Grantové agentury České republiky 203/09/0812.



## 7. Seznam literatury

1. Macpherson, G. (1999) *Black's Medical Dictionary* (Madison Books, London). 339th Ed.
2. Penning, T.M. (2011) *Chemical Carcinogenesis* (Humana Press, London). 1st Ed.
3. Klingenberg, M. (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **75**, 376-386.
4. Nelson, D.R. (2011) Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. *Biochim. Biophys. Acta.* **1814**, 14-18.
5. Lewis, D.F., Watson, E., Lake, B.G. (1998) Evolution of the cytochrome P450 superfamily: sequence alignments and pharmacogenetics. *Mutat. Res.* **410**, 245-270.
6. McLean, M.A., Maves, S.A., Weiss, K.E., Krepich, S., Sligar, S.G. (1998) Characterization of a cytochrome P450 from the acidothermophilic archaea *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **252**, 166-172.
7. Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Kemper, B., Levin, W. (1987) The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA.* **6**, 1-11.
8. Denisov, I.G., Makris, T.M., Sligar, S.G., Schlichting, I. (2005) Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem. Rev.* **105**, 2253-2277.
9. Collman, J.P., Sorrell, T.N., Dawson, J.H., Trudell, J.R., Bunnenberg, E., Djerassi, C. (1976) Magnetic circular dichroism of ferrous carbonyl adducts of cytochromes P-450 and P-420 and their synthetic models: further evidence for mercaptide as the fifth ligand to iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 6-10.
10. Meunier, B., de Visser, S.P., Shaik, S. (2004) Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes. *Chem. Rev.* **104**, 3947-3980.
11. Nebert, D.W., Gonzalez, F.J. (1987) P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 945-993.
12. Paine, M. J., Scrutton, N. S., Munro A. W., Gutierrez A., Roberts G. C., Wolf C. R. v *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (Springer, New York), s 115-148.. 3rd Ed.
13. Neve, E.P.A., Ingelman-Sundberg, M. (2008) Intracellular transport and localization of microsomal cytochrome P450. *Anal Bioanal Chem.* **392**, 1075-1084.
14. Harding, B.W., Wong, S.H., Nelson, D.H. (1964) Carbon monoxide-combining substances in rat adrenal. *Biochim. Biophys. Acta.* **92**, 415-417.
15. Bar-Nun, S., Kreibich, G., Adesnik, M., Alterman, L., Negishi, M., Sabatini, D.D. (1980) Synthesis and insertion of cytochrome P-450 into endoplasmic reticulum membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 965-969.
16. Szczesna-Skorupa, E., Kemper, B. (1989) NH<sub>2</sub>-terminal substitutions of basic amino acids induce translocation across the microsomal membrane and glycosylation of rabbit cytochrome P450IIC<sub>2</sub>. *J. Cell Biol.* **108**, 1237-1243.
17. Cholesterol side-chain cleavage enzyme, mitochondrial precursor - Homo sapiens

- (Human) URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/P05108> [Přístup červenec 24, 2011].
18. Omura, T. (2006) Mitochondrial P450s. *Chem. Biol. Interact.* **163**, 86-93.
  19. Ou, W.J., Ito, A., Morohashi, K., Fujii-Kuriyama, Y., Omura, T. (1986) Processing-independent in vitro translocation of cytochrome P-450(SCC) precursor across mitochondrial membranes. *J. Biochem.* **100**, 1287-1296.
  20. Neve, E.P., Ingelman-Sundberg, M. (1999) A soluble NH<sub>2</sub>-terminally truncated catalytically active form of rat cytochrome P450 2E1 targeted to liver mitochondria(1). *FEBS Lett.* **460**, 309-314.
  21. Robin, M.A., Anandatheerthavarada, H.K., Fang, J.K., Cudic, M., Otvos, L., Avadhani, N.G. (2001) Mitochondrial targeted cytochrome P450 2E1 (P450 MT5) contains an intact N terminus and requires mitochondrial specific electron transfer proteins for activity. *J. Biol. Chem.* **276**, 24680-24689.
  22. Addya, S., Anandatheerthavarada, H.K., Biswas, G., Bhagwat, S.V., Mullick, J., Avadhani, N.G. (1997) Targeting of NH<sub>2</sub>-terminal-processed microsomal protein to mitochondria: a novel pathway for the biogenesis of hepatic mitochondrial P450MT2. *J. Cell Biol.* **139**, 589-599.
  23. Anandatheerthavarada, H.K., Biswas, G., Mullick, J., Sepuri, N.B., Otvos, L., Pain, D., Avadhani, N.G. (1999) Dual targeting of cytochrome P4502B1 to endoplasmic reticulum and mitochondria involves a novel signal activation by cyclic AMP-dependent phosphorylation at ser128. *EMBO J.* **18**, 5494-5504.
  24. Loeper, J., Descatoire, V., Maurice, M., Beaune, P., Belghiti, J., Houssin, D., Ballet, F., Feldmann, G., Guengerich, F.P., Pessayre, D. (1993) Cytochromes P-450 in human hepatocyte plasma membrane: recognition by several autoantibodies. *Gastroenterology*. **104**, 203-216.
  25. Lecoecur, S., André, C., Beaune, P.H. (1996) Tienilic acid-induced autoimmune hepatitis: anti-liver and-kidney microsomal type 2 autoantibodies recognize a three-site conformational epitope on cytochrome P4502C9. *Mol. Pharmacol.* **50**, 326-333.
  26. Eliasson, E., Kenna, J.G. (1996) Cytochrome P450 2E1 is a cell surface autoantigen in halothane hepatitis. *Mol. Pharmacol.* **50**, 573-582.
  27. Clot, P., Albano, E., Eliasson, E., Tabone, M., Aricò, S., Israel, Y., Moncada, C., Ingelman-Sundberg, M. (1996) Cytochrome P4502E1 hydroxyethyl radical adducts as the major antigen in autoantibody formation among alcoholics. *Gastroenterology*. **111**, 206-216.
  28. De Lemos-Chiarandini, C., Frey, A.B., Sabatini, D.D., Kreibich, G. (1987) Determination of the membrane topology of the phenobarbital-inducible rat liver cytochrome P-450 isoenzyme PB-4 using site-specific antibodies. *J. Cell Biol.* **104**, 209-219.
  29. Loeper, J., Descatoire, V., Maurice, M., Beaune, P., Feldmann, G., Larrey, D., Pessayre, D. (1990) Presence of functional cytochrome P-450 on isolated rat hepatocyte plasma membrane. *Hepatology*. **11**, 850-858.
  30. Loeper, J., Louérat-Oriou, B., Duport, C., Pompon, D. (1998) Yeast expressed cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) exposed on the external face of plasma membrane is functionally competent. *Mol. Pharmacol.* **54**, 8-13.

31. Neve, E.P., Eliasson, E., Pronzato, M.A., Albano, E., Marinari, U., Ingelman-Sundberg, M. (1996) Enzyme-specific transport of rat liver cytochrome P450 to the Golgi apparatus. *Arch. Biochem. Biophys.* **333**, 459-465.
32. Nelson, D.R. (2009) The cytochrome p450 homepage. *Hum. Genomics.* **4**, 59-65.
33. Omura, T. (1966) Isolation from adrenal cortex of a nonheme iron protein and a flavoprotein functional as a reduced triphosphopyridine nucleotide-cytochrome P-450 reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* **117**, 660-673.
34. Lu, A.Y., Coon, M.J. (1968) Role of hemoprotein P-450 in fatty acid omega-hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **243**, 1331-1332.
35. Yasukochi, Y., Masters, B.S. (1976) Some properties of a detergent-solubilized NADPH-cytochrome c(cytochrome P-450) reductase purified by biospecific affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* **251**, 5337-5344.
36. Hildebrandt, A., Estabrook, R.W. (1971) Evidence for the participation of cytochrome b 5 in hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **143**, 66-79.
37. Bell, L.C., Guengerich, F.P. (1997) Oxidation kinetics of ethanol by human cytochrome P450 2E1. Rate-limiting product release accounts for effects of isotopic hydrogen substitution and cytochrome b5 on steady-state kinetics. *J. Biol. Chem.* **272**, 29643-29651.
38. Schenkman, J.B., Voznesensky, A.I., Jansson, I. (1994) Influence of ionic strength on the P450 monooxygenase reaction and role of cytochrome b5 in the process. *Arch. Biochem. Biophys.* **314**, 234-241.
39. Perret, A., Pompon, D. (1998) Electron shuttle between membrane-bound cytochrome P450 3A4 and b5 rules uncoupling mechanisms. *Biochemistry.* **37**, 11412-11424.
40. Gruenke, L.D., Konopka, K., Cadieu, M., Waskell, L. (1995) The stoichiometry of the cytochrome P-450-catalyzed metabolism of methoxyflurane and benzphetamine in the presence and absence of cytochrome b5. *J. Biol. Chem.* **270**, 24707-24718.
41. Yamazaki, H., Shimada, T., Martin, M.V., Guengerich, F.P. (2001) Stimulation of cytochrome P450 reactions by apo-cytochrome b5: evidence against transfer of heme from cytochrome P450 3A4 to apo-cytochrome b5 or heme oxygenase. *J. Biol. Chem.* **276**, 30885-30891.
42. Guengerich F. P. v *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (Springer, New York), s 115-148.. 3rd Ed.
43. Bourdi, M., Larrey, D., Nataf, J., Bernuau, J., Pessayre, D., Iwasaki, M., Guengerich, F.P., Beaune, P.H. (1990) Anti-liver endoplasmic reticulum autoantibodies are directed against human cytochrome P-450IA2. A specific marker of dihydralazine-induced hepatitis. *J. Clin. Invest.* **85**, 1967-1973.
44. Guengerich, F.P. (2008) Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 70-83.
45. Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Koblas, T., Hodek, P. (2005) Expression of cytochrome P450 1A1 and its contribution to oxidation of a potential human

- carcinogen 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) in human livers. *Cancer Lett.* **220**, 145-154.
46. Pavek, P., Dvorak, Z. (2008) Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr. Drug Metab.* **9**, 129-143.
  47. Miksys, S.L., Tyndale, R.F. (2002) Drug-metabolizing cytochrome P450s in the brain. *J Psychiatry Neurosci.* **27**, 406-415.
  48. Sarikaya, D., Bilgen, C., Kamataki, T., Topcu, Z. (2006) Comparative cytochrome P450 -1A1, -2A6, -2B6, -2C, -2D6, -2E1, -3A5 and -4B1 expressions in human larynx tissue analysed at mRNA level. *Biopharm Drug Dispos.* **27**, 353-359.
  49. Mercurio, M.G., Shiff, S.J., Galbraith, R.A., Sassa, S. (1995) Expression of cytochrome P450 mRNAs in the colon and the rectum in normal human subjects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**, 350-355.
  50. Shimada, T., Fujii-Kuriyama, Y. (2004) Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.* **95**, 1-6.
  51. Shimada, T., Yamazaki, H., Foroozesh, M., Hopkins, N.E., Alworth, W.L., Guengerich, F.P. (1998) Selectivity of polycyclic inhibitors for human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 1048-1056.
  52. Lewis, B.C., Mackenzie, P.I., Miners, J.O. (2007) Comparative homology modeling of human cytochrome P4501A1 (CYP1A1) and confirmation of residues involved in 7-ethoxyresorufin O-deethylation by site-directed mutagenesis and enzyme kinetic analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **468**, 58-69.
  53. Anandatheerthavarada, H.K., Vijayasarathy, C., Bhagwat, S.V., Biswas, G., Mullick, J., Avadhani, N.G. (1999) Physiological role of the N-terminal processed P4501A1 targeted to mitochondria in erythromycin metabolism and reversal of erythromycin-mediated inhibition of mitochondrial protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **274**, 6617-6625.
  54. CYP1A1 URL: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a1.htm> [Přístup březem 30, 2011].
  55. Hayashi, S., Watanabe, J., Nakachi, K., Kawajiri, K. (1991) Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450IA1 gene. *J. Biochem.* **110**, 407-411.
  56. Tefre, T., Ryberg, D., Haugen, A., Nebert, D.W., Skaug, V., Brøgger, A., Børresen, A.L. (1991) Human CYP1A1 (cytochrome P(1)450) gene: lack of association between the Msp I restriction fragment length polymorphism and incidence of lung cancer in a Norwegian population. *Pharmacogenetics.* **1**, 20-25.
  57. Wedlund, P.J., Kimura, S., Gonzalez, F.J., Nebert, D.W. (1994) 1462V mutation in the human CYP1A1 gene: lack of correlation with either the Msp I 1.9 kb (M2) allele or CYP1A1 inducibility in a three-generation family of east Mediterranean descent. *Pharmacogenetics.* **4**, 21-26.
  58. Turesky, R.J., Constable, A., Richoz, J., Varga, N., Markovic, J., Martin, M.V., Guengerich, F.P. (1998) Activation of heterocyclic aromatic amines by rat and human liver microsomes and by purified rat and human cytochrome P450 1A2. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 925-936.

59. Bernauer, U., Heinrich-Hirsch, B., Tönnies, M., Peter-Matthias, W., Gundert-Remy, U. (2006) Characterisation of the xenobiotic-metabolizing Cytochrome P450 expression pattern in human lung tissue by immunochemical and activity determination. *Toxicol. Lett.* **164**, 278-288.
60. Strobel, H.W., Kawashima, H., Geng, J., Sequeira, D., Bergh, A., Hodgson, A.V., Wang, H., Shen, S. (1995) Expression of multiple forms of brain cytochrome P450. *Toxicol. Lett.* **82-83**, 639-643.
61. Nebert, D.W., Dalton, T.P., Okey, A.B., Gonzalez, F.J. (2004) Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J. Biol. Chem.* **279**, 23847-23850.
62. Vistisen, K., Poulsen, H.E., Loft, S. (1992) Foreign compound metabolism capacity in man measured from metabolites of dietary caffeine. *Carcinogenesis*. **13**, 1561-1568.
63. Wrighton, S.A., Campanile, C., Thomas, P.E., Maines, S.L., Watkins, P.B., Parker, G., Mendez-Picon, G., Haniu, M., Shively, J.E., Levin, W. (1986) Identification of a human liver cytochrome P-450 homologous to the major isosafrole-inducible cytochrome P-450 in the rat. *Mol. Pharmacol.* **29**, 405-410.
64. Sansen, S., Yano, J.K., Reynald, R.L., Schoch, G.A., Griffin, K.J., Stout, C.D., Johnson, E.F. (2007) Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2. *J. Biol. Chem.* **282**, 14348-14355.
65. Distlerath, L.M., Reilly, P.E., Martin, M.V., Davis, G.G., Wilkinson, G.R., Guengerich, F.P. (1985) Purification and characterization of the human liver cytochromes P-450 involved in debrisoquine 4-hydroxylation and phenacetin O-deethylation, two prototypes for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J. Biol. Chem.* **260**, 9057-9067.
66. Daly, A.K. (2003) Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes. *Fundam Clin Pharmacol.* **17**, 27-41.
67. Yamazaki, H., Shaw, P.M., Guengerich, F.P., Shimada, T. (1998) Roles of cytochromes P450 1A2 and 3A4 in the oxidation of estradiol and estrone in human liver microsomes. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 659-665.
68. Sesardic, D., Boobis, A.R., Murray, B.P., Murray, S., Segura, J., de la Torre, R., Davies, D.S. (1990) Furafylline is a potent and selective inhibitor of cytochrome P450IA2 in man. *Br J Clin Pharmacol.* **29**, 651-663.
69. CYP1A2 allele nomenclature URL: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a2.htm> [Přístup března 30, 2011].
70. Sachse, C., Brockmöller, J., Bauer, S., Roots, I. (1999) Functional significance of a C-->A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *Br J Clin Pharmacol.* **47**, 445-449.
71. Allorge, D., Chevalier, D., Lo-Guidice, J.-M., Cauffiez, C., Suard, F., Baumann, P., Eap, C.B., Broly, F. (2003) Identification of a novel splice-site mutation in the CYP1A2 gene. *Br J Clin Pharmacol.* **56**, 341-344.
72. Renaud, J.P., Peyronneau, M.A., Urban, P., Truan, G., Cullin, C., Pompon, D., Beaune, P., Mansuy, D. (1993) Recombinant yeast in drug metabolism. *Toxicology*.

- 82, 39-52.
73. Buters, J.T., Korzekwa, K.R., Kunze, K.L., Omata, Y., Hardwick, J.P., Gonzalez, F.J. (1994) cDNA-directed expression of human cytochrome P450 CYP3A4 using baculovirus. *Drug Metab. Dispos.* **22**, 688-692.
  74. Crespi, C.L., Penman, B.W., Steimel, D.T., Gelboin, H.V., Gonzalez, F.J. (1991) The development of a human cell line stably expressing human CYP3A4: role in the metabolic activation of aflatoxin B1 and comparison to CYP1A2 and CYP2A3. *Carcinogenesis*. **12**, 355-359.
  75. Yun, C.-H., Yim, S.-K., Kim, D.-H., Ahn, T. (2006) Functional expression of human cytochrome P450 enzymes in Escherichia coli. *Curr. Drug Metab.* **7**, 411-429.
  76. Barnes, H.J., Arlotto, M.P., Waterman, M.R. (1991) Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 5597-5601.
  77. Looman, A.C., Bodlaender, J., Comstock, L.J., Eaton, D., Jhurani, P., de Boer, H.A., van Knippenberg, P.H. (1987) Influence of the codon following the AUG initiation codon on the expression of a modified lacZ gene in Escherichia coli. *EMBO J.* **6**, 2489-2492.
  78. Sandhu, P., Guo, Z., Baba, T., Martin, M.V., Tukey, R.H., Guengerich, F.P. (1994) Expression of modified human cytochrome P450 1A2 in Escherichia coli: stabilization, purification, spectral characterization, and catalytic activities of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **309**, 168-177.
  79. Richardson, T.H., Jung, F., Griffin, K.J., Wester, M., Raucy, J.L., Kemper, B., Bornheim, L.M., Hassett, C., Omiecinski, C.J., Johnson, E.F. (1995) A universal approach to the expression of human and rabbit cytochrome P450s of the 2C subfamily in Escherichia coli. *Arch. Biochem. Biophys.* **323**, 87-96.
  80. Davies, C., Witham, K., Scott, J.R., Pearson, A., DeVoss, J.J., Graham, S.E., Gillam, E.M.J. (2004) Assessment of arginine 97 and lysine 72 as determinants of substrate specificity in cytochrome P450 2C9 (CYP2C9). *Drug Metab. Dispos.* **32**, 431-436.
  81. Ahn, T., Yun, C.-H. (2004) High-level expression of human cytochrome P450 3A4 by co-expression with human molecular chaperone HDJ-1 (Hsp40). *Arch. Pharm. Res.* **27**, 319-323.
  82. Ahn, T., Yang, S., Yun, C.-H. (2004) Enhanced expression of human cytochrome P450 1A2 by co-expression with human molecular chaperone Hsp70. *Toxicol. Lett.* **153**, 267-272.
  83. Pritchard, M.P., Ossetian, R., Li, D.N., Henderson, C.J., Burchell, B., Wolf, C.R., Friedberg, T. (1997) A general strategy for the expression of recombinant human cytochrome P450s in Escherichia coli using bacterial signal peptides: expression of CYP3A4, CYP2A6, and CYP2E1. *Arch. Biochem. Biophys.* **345**, 342-354.
  84. Dong, J., Porter, T.D. (1996) Coexpression of mammalian cytochrome P450 and reductase in Escherichia coli. *Arch. Biochem. Biophys.* **327**, 254-259.
  85. Parikh, A., Gillam, E.M., Guengerich, F.P. (1997) Drug metabolism by Escherichia coli expressing human cytochromes P450. *Nat. Biotechnol.* **15**, 784-788.
  86. Chun, Y.J., Jeong, T.C., Roh, J.K., Guengerich, F.P. (1997) Characterization of a

- fusion protein between human cytochrome P450 1A1 and rat NADPH-P450 oxidoreductase in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**, 211-214.
87. Chun, Y.J., Shimada, T., Guengerich, F.P. (1996) Construction of a human cytochrome P450 1A1: rat NADPH-cytochrome P450 reductase fusion protein cDNA and expression in *Escherichia coli*, purification, and catalytic properties of the enzyme in bacterial cells and after purification. *Arch. Biochem. Biophys.* **330**, 48-58.
  88. Guo, Z., Gillam, E.M., Ohmori, S., Tukey, R.H., Guengerich, F.P. (1994) Expression of modified human cytochrome P450 1A1 in *Escherichia coli*: effects of 5' substitution, stabilization, purification, spectral characterization, and catalytic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **312**, 436-446.
  89. Kaderbhai, M.A., Ugochukwu, C.C., Lamb, D.C., Kelly, S.L. (2000) Targeting of active human cytochrome P4501A1 (CYP1A1) to the periplasmic space of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 803-807.
  90. Fisher, C.W., Caudle, D.L., Martin-Wixtrom, C., Quattrochi, L.C., Tukey, R.H., Waterman, M.R., Estabrook, R.W. (1992) High-level expression of functional human cytochrome P450 1A2 in *Escherichia coli*. *FASEB J.* **6**, 759-764.
  91. Ahn, T., Yang, S., Yun, C.-H. (2004) Enhanced expression of human cytochrome P450 1A2 by co-expression with human molecular chaperone Hsp70. *Toxicol. Lett.* **153**, 267-272.
  92. Ahn, T., Yun, C.-H. (2004) High-level expression of human cytochrome P450 3A4 by co-expression with human molecular chaperone HDJ-1 (Hsp40). *Arch. Pharm. Res.* **27**, 319-323.
  93. Wrighton, S.A., Campanile, C., Thomas, P.E., Maines, S.L., Watkins, P.B., Parker, G., Mendez-Picon, G., Haniu, M., Shively, J.E., Levin, W. (1986) Identification of a human liver cytochrome P-450 homologous to the major isosafrole-inducible cytochrome P-450 in the rat. *Mol. Pharmacol.* **29**, 405-410.
  94. Dong, M.S., Bell, L.C., Guo, Z., Phillips, D.R., Blair, I.A., Guengerich, F.P. (1996) Identification of retained N-formylmethionine in bacterial recombinant mammalian cytochrome P450 proteins with the N-terminal sequence MALLLAVFL...: roles of residues 3-5 in retention and membrane topology. *Biochemistry.* **35**, 10031-10040.
  95. Kim, H.-J., Lee, S.-B., Guengerich, F.P., Park, Y.I., Dong, M.-S. (2007) Effects of N-terminal modification of recombinant human cytochrome P450 1A2 on catalytic activity. *Xenobiotica.* **37**, 356-365.
  96. Kim, D.-H., Kim, K.-H., Isin, E.M., Guengerich, F.P., Chae, H.Z., Ahn, T., Yun, C.-H. (2008) Heterologous expression and characterization of wild-type human cytochrome P450 1A2 without conventional N-terminal modification in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **57**, 188-200.
  97. Barnes, H.J. (1996) Maximizing expression of eukaryotic cytochrome P450s in *Escherichia coli*. *Meth. Enzymol.* **272**, 3-14.
  98. Gegner, J.A., Dahlquist, F.W. (1991) Signal transduction in bacteria: CheW forms a reversible complex with the protein kinase CheA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 750-754.
  99. Wolf, C.H., Friedberg, T.H., Pritchard, M.P. (2003) *Cytochrome P450 expression in enterobacteria* (US 2003/0215915 AI, United States Patent and Trademark Office).

100. de Boer, H.A., Comstock, L.J., Vasser, M. (1983) The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 21-25.
101. Muchmore, D.C., McIntosh, L.P., Russell, C.B., Anderson, D.E., Dahlquist, F.W. (1989) Expression and nitrogen-15 labeling of proteins for proton and nitrogen-15 nuclear magnetic resonance. *Meth. Enzymol.* **177**, 44-73.
102. Silverstone, A.E., Arditti, R.R., Magasanik, B. (1970) Catabolite-insensitive revertants of lac promoter mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **66**, 773-779.
103. Sambrook, J. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). 3rd Ed.
104. Hershfield, V., Boyer, H.W., Yanofsky, C., Lovett, M.A., Helinski, D.R. (1974) Plasmid ColEI as a molecular vehicle for cloning and amplification of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 3455-3459.
105. Müller-Hill, B., Crapo, L., Gilbert, W. (1968) Mutants that make more lac repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **59**, 1259-1264.
106. pUC19 URL:  
[http://www.neb.com/nebecomm/tech\\_reference/restriction\\_enzymes/maps/pUC19\\_map.pdf](http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/restriction_enzymes/maps/pUC19_map.pdf) [Přístup srpen 25, 2011].
107. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. **33**, 103-119.
108. Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* **185**, 60-89.
109. Chamberlin, M., McGrath, J., Waskell, L. (1970) New RNA polymerase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T7. *Nature*. **228**, 227-231.
110. Addgene - pET-22b(+)-HpENR Plasmid Data URL: <http://www.addgene.org/12651/> [Přístup srpen 26, 2011].
111. Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
112. Davanloo, P., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Studier, F.W. (1984) Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 2035-2039.
113. Francis, D.M., Page, R. (2010) Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Curr Protoc Protein Sci.* **Chapter 5**, Unit 5.24.1-29.
114. Cohen, S.N., Chang, A.C., Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 2110-2114.
115. Dvořák M. (2008) *Příprava vektoru pro heterologní expresi mutančního cytochromu P450 1A1* (Diplomová práce, Katedra biochemie, PřF UK, Praha).
116. Double Digest Finder, NEB URL:  
<http://www.neb.com/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp> [Přístup červenec 16, 2011].



117. Hálková T. (2010) *Příprava rekombinantního lidského cytochromu b5* (Diplomová práce, Katedra biochemie, PŘF UK, Praha).
118. 2-Log DNA Ladder (0.1–10.0 kb) (N3200), DNA Markers/Ladders, NEB URL: <http://www.neb.com/nebecomm/products/productn3200.asp> [Přístup červenec 16, 2011].
119. Weber, K., Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.
120. Pritchard M P, McLaughlin L, Friedberg T v *Cytochrome P450 Protocols*, s 19-29.. 2nd Ed.
121. Codon usage URL: <http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/in-vitro-genetics/codon-usage.html> [Přístup červenec 28, 2011].
122. Strocchi, M., Ferrer, M., Timmis, K.N., Golyshin, P.N. (2006) Low temperature-induced systems failure in *Escherichia coli*: insights from rescue by cold-adapted chaperones. *Proteomics*. **6**, 193-206.
123. Saribas, A.S., Gruenke, L., Waskell, L. (2001) Overexpression and purification of the membrane-bound cytochrome P450 2B4. *Protein Expr. Purif.* **21**, 303-309.
124. Pruitt, K.D., Harrow, J., Harte, R.A., Wallin, C., Diekhans, M., Maglott, D.R., Searle, S., Farrell, C.M., Loveland, J.E., Ruef, B.J., Hart, E., Suner, M.-M., Landrum, M.J., Aken, B., Ayling, S., Baertsch, R., Fernandez-Banet, J., Cherry, J.L., Curwen, V., Dicuccio, M., Kellis, M., Lee, J., Lin, M.F., Schuster, M., Shkeda, A., Amid, C., Brown, G., Dukhanina, O., Frankish, A., Hart, J., et al. (2009) The consensus coding sequence (CCDS) project: Identifying a common protein-coding gene set for the human and mouse genomes. *Genome Res.* **19**, 1316-1323.
125. OPTIMIZER URL: <http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/> [Přístup srpen 3, 2011].
126. Quattrochi, L.C., Pendurthi, U.R., Okino, S.T., Potenza, C., Tukey, R.H. (1986) Human cytochrome P-450 4 mRNA and gene: part of a multigene family that contains Alu sequences in its mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 6731-6735.
127. CYP1A2 URL: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a2.htm> [Přístup srpen 3, 2011].
128. Barnes, H.J. (1996) Maximizing expression of eukaryotic cytochrome P450s in *Escherichia coli*. *Meth. Enzymol.* **272**, 3-14.
129. Gillam, E.M., Guo, Z., Martin, M.V., Jenkins, C.M., Guengerich, F.P. (1995) Expression of cytochrome P450 2D6 in *Escherichia coli*, purification, and spectral and catalytic characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* **319**, 540-550.
130. Varshavsky, A. (1997) The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells*. **2**, 13-28.

Svoluji k zapůjčení této diplomové práce pro studijní účely a žádám, aby byla vedena řádná evidence vypůjčovatelů a ti byli upozorněni na to, že musí pramen převzatých údajů řádně citovat.

[illegible]